



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10313866 A**(43) Date of publication of application: **02 . 12 . 98**

(51) Int. Cl.

C12N 15/09
C12Q 1/02
G01N 33/53
G01N 33/566
// C07K 14/47
C12P 21/02
(C12P 21/02 , C12R 1:91)

(21) Application number: **09126118**(22) Date of filing: **15 . 05 . 97**(71) Applicant: **SHIONOGI & CO LTD**

(72) Inventor: **ODA SATOSHI**
IGARASHI HISANAGA
NAITO AKIRA
SAKAGUCHI TAKESHI
TAKAI YOSHIMI

(54) **SCREENING OF AGONIST OR ANTAGONIST OF DOC2ALPHA-MUNC13 COMBINATION**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To screen the subject agonist or antagonist by reacting Doc2 α , etc., with Munc13, etc., in the presence or absence of a candidate and subsequently selecting a candidate for increasing or decreasing the binding ability.

SOLUTION: This method for screening the candidate of an agonist or antagonist of a Doc2 α -Munc13 combination

comprises reacting Doc2 α or Doc2 α analogue with Munc13 or Munc13 analogue in the presence or absence of a candidate and selecting a candidate for increasing or decreasing their binding ability. The agonist or antagonist giving an effect to the binding ability of Munc13 to Doc2 α related to the release of a calcium ion-dependent neurotransmitter can thus be screened. The proteins can control the release of the neurotransmitter or hormone.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-313866

(43) 公開日 平成10年(1998)12月2日

(51) Int.Cl.⁶
C 1 2 N 15/09
C 1 2 Q 1/02
G 0 1 N 33/53
33/566
// C 0 7 K 14/47

識別記号
Z N A

F I

C 1 2 N 15/00
C 1 2 Q 1/02
G 0 1 N 33/53
33/566
C 0 7 K 14/47

Z N A A

B

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-126118

(22) 出願日 平成9年(1997)5月15日

(71) 出願人 000001926

塩野義製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

(72) 発明者 織田 聡

兵庫県川辺郡猪名川町つつじが丘1-22-5

(72) 発明者 五十嵐 久永

大阪府大阪市城東区古市3-1-2-712

(72) 発明者 内藤 陽

大阪府三島郡島本町若山台2-6-2-407

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Doc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 神経伝達物質またはホルモンの放出を制御する物質、およびその物質を用いるスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】 Doc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストの候補物質のスクリーニング方法であって、Doc2 α またはDoc2 α 類似体と、Munc13またはMunc13類似体とを、該候補物質の存在下および非存在下で反応させる工程；および、結合能を増加または減少させる該候補物質を選択する工程；を包含する、方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Doc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストの候補物質のスクリーニング方法であって、

Doc2 α またはDoc2 α 類似体と、Munc13またはMunc13類似体とを、該候補物質の存在下および非存在下で反応させる工程；および、

結合能を増加または減少させる該候補物質を選択する工程；を包含する、方法。

【請求項2】 前記Doc2 α またはDoc2 α 類似体が、キャリアタンパク質との融合タンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記Munc13またはMunc13類似体が、キャリアタンパク質との融合タンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記Doc2 α またはDoc2 α 類似体が、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の9位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～78位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～90位のアミノ酸配列、およびDoc2 α の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】 前記Munc13またはMunc13類似体が、Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列、Munc13-1の840位～1743位のアミノ酸配列およびMunc13-1の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1または3に記載の方法。

【請求項6】 前記Doc2 α 類似体が、Doc2 β の14位～38位のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記Munc13類似体が、Munc13-2の1110位～1695位のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 請求項1～7のいずれかに記載の方法によって得られる、Doc2 α とMunc13-1との結合のアゴニストまたはアンタゴニスト。

【請求項9】 神経伝達物質またはホルモンのカルシウムイオン依存性の分泌を阻害するために用いられる、Doc2 α またはDoc2 α 類似体を発現するベクター。

【請求項10】 前記Doc2 α またはDoc2 α 類似体が、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の9位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～78位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～90位のアミノ酸配列、およびDoc2 α の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項9に記載のベクター。

【請求項11】 前記Doc2 α またはDoc2 α 類似体が、Doc2 β の14位～38位のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項9に記載のベクター。

【請求項12】 神経伝達物質またはホルモンのカルシ

ウムイオン依存性の分泌を阻害するために用いられる、Munc13またはMunc13類似体を発現するベクター。

【請求項13】 前記Munc13またはMunc13類似体が、Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列、Munc13-1の840位～1743位のアミノ酸配列およびMunc13-1の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項12に記載のベクター。

【請求項14】 前記Munc13またはMunc13類似体が、Munc13-2の1110位～1695位のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項12に記載のベクター。

【請求項15】 Doc2 α またはDoc2 α 類似体とキャリアタンパク質との融合タンパク質。

【請求項16】 Munc13-1またはMunc13類似体とキャリアタンパク質との融合タンパク質。

【請求項17】 Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列を含み、かつMunc13-1に対する結合能を有する、90個以下のアミノ酸残基からなるポリペプチド。

【請求項18】 Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列を含み、かつDoc2 α に対する結合能を有する、904個以下のアミノ酸残基からなるポリペプチド。

【請求項19】 Doc2 α 類似体であって、90個以下のアミノ酸残基からなるポリペプチド。

【請求項20】 Munc13類似体であって、904個以下のアミノ酸残基からなるポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、Doc2 α とMunc13との結合に影響を与えるアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法；その方法に用いるペプチド；およびそのペプチドにより神経伝達物質またはホルモンの放出を調節する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】最近、カルシウムイオン依存性の神経伝達物質の放出に関与すると考えられるタンパク質として、Doc2 α 、Munc13-1などが報告された。

【0003】ヒトのcDNAライブラリーから単離され、発現されたDoc2タンパク質は、2つのC2領域を有することから、Double C2と命名されたタンパク質である[1および2]（以下、[]は、参考文献の番号を表し、参考文献はまとめて後に記載する）。Doc2タンパク質には、Doc2 α およびDoc2 β のタンパク質が含まれる。

【0004】Doc2 α は脳特異的に発現しており、Doc2 α をPC12細胞で過剰発現させると、カルシウムイオン依存性の分泌が促進されることから、神経伝達物質の放出において重要な役割を果たしていると考えられている[3]。

【0005】Doc2 β は、調べられた全ての組織で発現しており、細胞内に普遍的に存在する小胞輸送に関与していると考えられている[4]。

【0006】Doc2 α およびDoc2 β は、上記のように2つ

のC2領域を有しているが、膜貫通領域およびラブフィリン(Rab)3A結合領域を持たない。その代わり、Doc2 α およびDoc2 β は、Doc2に特異的なアミノ酸配列が保存されている領域(Doc2特異領域)を有している[4]。

【0007】Doc2 α およびDoc2 β が有するC2領域とは、最初にプロテインキナーゼCタンパク質[5および6]で発見された領域であり、カルシウムイオンおよびホスファチジルセリンと結合する領域である[7]。プロテインキナーゼC以外に、数種類のタンパク質がC2領域を持っていることが知られている。それらは、ホスフォリパーゼA2[8]、ホスフォリパーゼC γ [9]、unc-13[10]、Munc13-1[11]、シナプトタグミンI[12]、ラブフィリン3A[13]などである。

【0008】Munc13は、線虫(*Caenorhabditis elegans*)のunc-13遺伝子[14]と類似するラット遺伝子がコードしているタンパク質である。線虫のunc-13遺伝子が1つのC1領域および2つのC2領域を有するのに対して、Munc13は1つのC1領域および3つのC2領域を有する[10、11、15]。C1領域には、ホルボールエステル、ジアシルグリセロールおよびホスファチジルセリンなどのリン脂質が結合することが知られている[10および15]。線虫ではunc-13遺伝子の変異により、体内にアセチルコリンが蓄積し運動障害が起こることから、unc-13はアセチルコリンなどの神経伝達物質の放出に関与していると考えられている[16]。Munc13には3種類の類似したタンパク質Munc13-1、Munc13-2およびMunc13-3が存在していることが報告されている。いずれのMunc13も脳特異的に発現しており、Munc13-1はシナプス膜に存在することが報告されている[11]。これらのことから、Munc13もunc-13と同様に、神経伝達物質の放出に関与していると考えられている[11]。

【0009】以上のように、Doc2 α およびMunc13は、神経伝達物質の分泌において重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、Doc2 α およびMunc13が、どのような機構で神経伝達物質またはホルモンの分泌に関与しているかは全く明らかでなく、神経伝達物質またはホルモンの分泌を制御するために、その機構を解明することが望まれている。さらに、神経伝達物質またはホルモンの分泌に関与する物質のアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることで、より効果的な神経伝達物質またはホルモンの制御が期待されている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記問題点を解決するものであり、神経伝達物質またはホルモンの分泌を制御する物質、その物質を用いるスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、Doc2 α がMunc13-1(発見されている3つのMunc13のうちの1つ)と結合することを発見して、本発明を完成させたもので

ある。この発見に基づいて、以下の種々の知見が得られた。

【0012】(1)Doc2 α とMunc13-1の結合は、ホルボールエステルで処理することにより促進され、この促進効果はMunc13-1のC1領域を介して行なわれること、(2)Munc13-1のDoc2 α との結合に必要な領域をPC12細胞に発現させると、カルシウムイオン依存性の神経伝達物質およびホルモンの分泌が阻害されること、および、(3)Munc13-1のDoc2 α との結合に必要な領域と、Doc2 α とを同時に発現させると、カルシウムイオン依存性の分泌阻害効果は抑制されること。

【0013】以上から、ホルボールエステルで誘導されるDoc2 α とMunc13-1との結合は、カルシウムイオン依存性の神経伝達物質およびホルモンの分泌に重要な働きをしていると考えられる。このことは、ホルボールエステルがアゴニストとして作用していることを示唆する。

【0014】以上から、Doc2 α とMunc13-1との結合の速度、強度等を測定することにより、結合を阻害する物質(アンタゴニスト)あるいは促進する物質(アゴニスト)がスクリーニングできる。スクリーニングされた物質は神経細胞の神経伝達物質放出機能を制御することができ、それにより、神経疾患の治療薬、例えば、抗痴呆薬、抗てんかん薬、向精神薬、あるいは脳代謝改善薬として使用することが可能となる。

【0015】本発明のDoc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストの候補物質のスクリーニング方法は、Doc2 α またはDoc2 α 類似体と、Munc13またはMunc13類似体とを、該候補物質の存在下および非存在下で反応させる工程；および、結合能を増加または減少させる該候補物質を選択する工程；を包含する。

【0016】好ましい実施態様では、上記Doc2 α またはDoc2 α 類似体は、キャリアタンパク質との融合タンパク質である。

【0017】好ましい実施態様では、上記Munc13またはMunc13類似体は、キャリアタンパク質との融合タンパク質である。

【0018】好ましい実施態様では、上記Doc2 α またはDoc2 α 類似体は、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の9位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～78位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～90位のアミノ酸配列、およびDoc2 α の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0019】好ましい実施態様では、上記Munc13またはMunc13類似体は、Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列、Munc13-1の840位～1743位のアミノ酸配列およびMunc13-1の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0020】好ましい実施態様では、上記Doc2 α 類似体は、Doc2 β の14位～38位のアミノ酸配列を含むポリペ

チドである。

【0021】好ましい実施態様では、上記Munc13類似体は、Munc13-2の1110位～1695位のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0022】本発明のDoc2 α とMunc13-1との結合のアゴニストまたはアンタゴニストは、上記のいずれかの方法によって得られる。

【0023】本発明のDoc2 α またはDoc2 α 類似体を発現するベクターは、神経伝達物質またはホルモンのカルシウムイオン依存性の分泌を阻害するために用いられる。

【0024】好ましい実施態様では、上記Doc2 α またはDoc2 α 類似体は、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の9位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～78位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～90位のアミノ酸配列、およびDoc2 α の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0025】好ましい実施態様では、上記Doc2 α またはDoc2 α 類似体は、Doc2 β の14位～38位のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0026】本発明のMunc13またはMunc13類似体を発現するベクターは、神経伝達物質またはホルモンのカルシウムイオン依存性の分泌を阻害するために用いられる。

【0027】好ましい実施態様では、上記Munc13またはMunc13類似体は、Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列、Munc13-1の840位～1743位のアミノ酸配列およびMunc13-1の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0028】好ましい実施態様では、上記Munc13またはMunc13類似体は、Munc13-2の1110位～1695位のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0029】本発明の融合タンパク質は、Doc2 α またはDoc2 α 類似体とキャリアタンパク質との融合タンパク質である。

【0030】本発明の融合タンパク質は、Munc13-1またはMunc13類似体とキャリアタンパク質との融合タンパク質である。

【0031】本発明のポリペプチドは、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列を含み、かつMunc13-1に対する結合能を有する、90個以下のアミノ酸残基からなる。

【0032】本発明のポリペプチドは、Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列を含み、かつDoc2 α に対する結合能を有する、904個以下のアミノ酸残基からなる。

【0033】本発明のポリペプチドは、Doc2 α 類似体であって、90個以下のアミノ酸残基からなる。

【0034】本発明のポリペプチドは、Munc13類似体であって、904個以下のアミノ酸残基からなる。

【0035】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳しく説明する。

【0036】本発明においては、特に指示のない限り、

当該分野で公知である組換えDNA法、タンパク質の分離および分析法、および免疫学的手法が採用され得る。これらの方法を行う際には、市販の酵素、キット、抗体、標識物質などを使用し得る。

【0037】(Doc2 α) 本発明のスクリーニング方法に用いられるDoc2 α は、天然源及び組換え法により入手し得る。Doc2 α 類似体には天然の完全長Doc2 β が含まれ、さらに、天然のDoc2 α の一部の配列であって少なくともDoc2 α の13位～37位のアミノ酸配列Mid (Munc13-1-interacting domain of Doc2 α : 配列表の配列番号1) を含むポリペプチド、およびDoc2 α の13位～37位のアミノ酸配列中のアミノ酸の1またはそれ以上の置換または欠失、または、これらのアミノ酸配列中への1またはそれ以上のアミノ酸の挿入または付加を有する配列を含むポリペプチドであってMunc13-1に対する結合能を有する任意のポリペプチドが含まれる。アミノ酸の1またはそれ以上の置換、欠失、挿入または付加を有するポリペプチドは、当業者に周知の方法、例えば組換えDNA技術で作成され得る。

【0038】Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列を含むポリペプチドの例としては、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列からなるポリペプチド、Doc2 α の1位～37位のアミノ酸配列からなるポリペプチド、Doc2 α の9位～37位のアミノ酸配列からなるポリペプチド、Doc2 α の1位～78位のアミノ酸配列からなるポリペプチド、Doc2 α の1位～90位のアミノ酸配列からなるポリペプチド、およびDoc2 α の全アミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。Doc2 α は、キャリアタンパク質との融合タンパク質であってもよい。Doc2 α の全アミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列を配列番号2に示す。

【0039】(Munc13) 本発明のスクリーニング方法に用いられるMunc13またはMunc13類似体は天然源及び組換え法により入手し得る。Munc13としては、Munc13-1、Munc13-2、およびMunc13-3が用いられ得る。Munc13類似体には、天然のMunc13の一部の配列であって少なくともMunc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列Did (Doc2 α -interacting domain of Munc13-1 : 配列表の配列番号3) を含むポリペプチド、および、このアミノ酸配列中のアミノ酸の1またはそれ以上の置換または欠失、または、これらのアミノ酸配列中への1またはそれ以上のアミノ酸の挿入または付加を有する配列を含むポリペプチドであってDoc2 α に対する結合能を有する任意のポリペプチドが含まれる。Munc13-1の全アミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列を配列番号4に示す。

【0040】本発明のスクリーニング方法に用いられるDoc2 α 、Doc2 α 類似体、Munc13およびMunc13類似体は、キャリアタンパク質との融合タンパク質であり得る。キャリアタンパク質として使用されるタンパク質の例としては、グルタチオンSトランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ(6つの連続するヒスチジンからなるアミノ酸配

列)、およびマルトース結合タンパク質が挙げられる。これらの融合タンパク質は、例えば当業者に周知の組換えDNA法で調製され得る。

【0041】(Doc2 α と結合するポリペプチドをコードするDNAの分離) Doc2 α または2 α 類似体と結合するポリペプチドをコードするDNAは、例えばtwo-hybrid法を用いて単離され得る。two-hybrid法の原理は、転写因子に存在するDNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインの2つのドメインを利用する。転写因子のDNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインの2つのドメインが同一タンパク質分子として発現した場合、転写が活性化される。しかし、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインの2つのドメインを切り離して発現させても転写は活性化されない。他方で、別々に発現させたDNA結合ドメインと転写活性化ドメインとの結合を仲介する物質XとYとが存在すれば、DNA結合ドメインと転写活性化ドメインとが同一タンパク質分子として機能し、転写を活性化させる。従って、同一細胞内で、転写活性化ドメインと物質Xとの融合タンパク質、およびDNA結合ドメインと物質Yとの融合タンパク質を同時に発現させ、転写活性を測定することにより、物質Xと物質Yとが結合する

可否かが決定される。

【0042】本発明におけるtwo-hybrid法は、まず、Doc2 α のMunc13-1との結合領域のコード配列を転写活性化ドメインのDNA配列に結合させたプラスミド、およびスクリーニングされるポリペプチドのコード配列をDNA結合ドメインのDNA配列に結合させたプラスミドを作製する。そして、この2つのプラスミドを、レポーター遺伝子(例えば β -ガラクトシダーゼ遺伝子)およびそのプロモーター配列を有する宿主に同時に形質転換して、レポーター遺伝子の発現を確認する。レポーター遺伝子の発現が確認されれば、Doc2 α と結合するポリペプチドのDNAが取得される。なお、レポーター遺伝子およびそのプロモーター配列は、上記2つのプラスミドのいずれかに含まれていてもよい。

【0043】Doc2 α またはDoc2 α 類似体と結合するポリペプチドをコードするDNAは、種々のライブラリーから得られ得る。哺乳動物の脳由来のcDNAから作製されたライブラリーが好ましく、ヒトまたはラットの脳由来のcDNAから作製されたライブラリーがより好ましく、ラットの脳由来のcDNAから作製されたライブラリーがさらに好ましい。

【0044】(Doc2 α と結合するタンパク質の同定およびそのタンパク質をコードする全長cDNAの単離) 上記で得られたDNA配列を、プログラムBLASTおよびデータベースGenBankを用いてホモロジー検索し、Munc13-1遺伝子の一部であることが確認される。次に、このDNA配列をプローブとして標識を行い、例えば、コロニーハイブリダイゼーション法を用いて任意のcDNAライブラリーをクローニングすることにより、Munc13-1遺伝子の全長を

コードするcDNAを単離することができる。●単離されたcDNAは、当業者に周知の方法によって配列決定される。

【0045】(Munc13-1のDoc2 α 結合領域の決定) 上記で得られるMunc13-1の全長cDNAから、種々の欠失変異体DNAを作製し、このDNAによりコードされるペプチドとDoc2 α またはDoc2 α 類似体との結合の有無および強さを調べることにより、Munc13-1のDoc2 α 結合領域を決定し得る。

【0046】これは、例えばtwo hybrid法を用いて以下のように行い得る。上記で得られるMunc13-1全長cDNAの配列をもとに欠失変異体を得るための種々のプライマーを設計する。1つの欠失変異体ごとに、全長cDNA(鋳型DNA)、Ampli Taq DNA Polymerase、1組のプライマー、10 \times PCR用緩衝液、およびdNTP(dATP、dGTP、dTTP、およびdCTP)を用いて、使用するプライマーに適切なPCR反応条件でPCR反応を行い、欠失変異体DNA断片を増幅する。得られた欠失変異体DNA断片を、two hybrid法におけるDNA結合ドメインをコードするプラスミドに挿入し、プラスミドを作製する。他方で、Doc2 α のアミノ酸配列の1位~90位に相当するcDNAを、two hybrid法における転写活性化ドメインをコードする遺伝子を含むプラスミドに挿入してプラスミドを作製する。この作製した2つのプラスミドで同一の細胞を形質転換する。上記の「Munc13-1のDoc2 α 結合領域の決定」と同様に、形質転換細胞におけるレポーター遺伝子の発現の有無を確認することにより相互作用の有無を知ることができる。また、レポーター遺伝子の発現量を測定することにより結合の強さを知ることができ、種々の欠失変異体の結合の強さを比較することにより、Doc2 α との結合に必要な部位を特定し得る。

【0047】あるいは、Doc2 α を単離し、種々の改変されたMunc13タンパク質との結合性を検討することによっても、結合領域を決定し得る。

【0048】(Doc2 α のMunc13-1結合領域の決定) Doc2 α の全長cDNAから、種々の欠失変異体DNAを作製し、このDNAによりコードされるペプチドとMunc13-1との結合の有無および強さを調べることにより、Doc2 α のMunc13-1結合領域を決定し得る。

【0049】これは、上記「Munc13-1のDoc2 α 結合領域の決定」と同様にして、Doc2 α (1位~90位)の代わりにMunc13-1(851位~1461位)を用い、上記のMunc13-1の欠失変異体の代わりにDoc2 α の欠失変異体を用いたtwo-hybrid法により行い得る。

【0050】(組換えDoc2 α およびMunc13タンパク質の精製) 本発明のスクリーニング方法に用いられるDoc2 α またはDoc2 α 類似体およびMunc13またはMunc13類似体は、Doc2 α またはDoc2 α 類似体をコードするDNAまたはMunc13またはMunc13類似体をコードするDNAを、適切なベクターに組み込んだ発現ベクターを用いて調製され得る。この発現ベクターを、例えば、細菌、酵母、昆虫細

胞、または動物細胞に導入して、形質転換体を作製し培養する。目的のタンパク質は当業者に周知の精製方法

(イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなど)を用いて培養物中から精製される。それぞれのタンパク質をキャリアタンパク質との融合タンパク質として発現させる場合、キャリアタンパク質を特異的に吸着するカラム(例えば、アフィニティークラム)を用いることにより、融合タンパク質を容易に精製し得る。

【0051】(インビトロでのDoc2 α とMunc13との結合) Doc2 α またはDoc2 α 類似体およびMunc13またはMunc13類似体を用いて、その結合をインビトロで試験する。これは例えば、以下のような方法で行われる。

【0052】Munc13またはMunc13類似体をコードするDNAを、適切なin vitro translation用プラスミドに挿入し、得られたプラスミドを用いて標識アミノ酸の存在下でin vitro translationを行い、そして標識されたMunc13またはMunc13類似体を得る。他方でDoc2 α またはDoc2 α 類似体(キャリアタンパク質との融合タンパク質であり得る)を、カラムに吸着させる。ペプチドを吸着させたカラムに標識されたMunc13またはMunc13類似体をアプライシ、適切な条件(例えば、4℃で5時間)で結合緩衝液中でインキュベートし、Doc2 α またはDoc2 α 類似体とMunc13またはMunc13類似体とを結合させる。結合したMunc13またはMunc13類似体をカラムから溶出し、溶出物のSDS-PAGEを行い、得られた泳動ゲルを用いてX線フィルムを感光および現像することによって確認することにより、結合したタンパク質の存在および量を確認し得る。

【0053】(インビボでのDoc2 α とMunc13との結合の確認) Doc2 α またはDoc2 α 類似体と、Munc13またはMunc13類似体とがインビボで結合していることを確認するために、Doc2 α またはDoc2 α 類似体をコードするDNAおよびMunc13またはMunc13類似体をコードするDNAを、それぞれ異なるタグとの融合タンパク質として発現し得るように適切なベクターに挿入して発現ベクターを作製する。得られた2つの発現ベクターを細菌、酵母、昆虫細胞、または動物細胞に導入して同時に発現させる。細胞を溶解し、一方のタグを吸着するカラムを用いてタンパク質を吸着し、吸着されたタンパク質に他方のタグがあるか否かを検出する。検出は、ウェスタンブロッティング法によって行い得る。あるいは、いずれか一方をタグしておき、タグを吸着させ、他方のタンパク質を抗体を用いるウェスタンブロッティング法により検出する方法もある。タンパク質が検出されれば、Doc2 α またはDoc2 α 類似体とMunc13またはMunc13類似体とがインビボで結合することが示される。

【0054】(カルシウムイオン依存性の、神経伝達物質の分泌またはホルモンの分泌に対するDoc2 α 類似体またはMunc13類似体の影響) Doc2 α 類似体またはMunc13類

似体をコードするDNA断片を適切なベクターに挿入し、発現ベクターを作製する。この発現ベクターを、カルシウムイオン依存性の神経伝達物質またはホルモン分泌を行う細胞に導入し、形質転換体を作製する。この形質転換体および非形質転換体を、カルシウムイオン依存性分泌の誘導条件下または非誘導条件下で培養し、分泌物の量を測定する。形質転換体の分泌量と、非形質転換体の分泌量を比較することにより、Doc2 α 類似体またはMunc13類似体がカルシウムイオン依存性分泌に影響を及ぼすか否かが確認される。

【0055】(Doc2 α とMunc13-1との結合に影響する物質のスクリーニング) 上記の「インビトロでのDoc2 α とMunc13との結合」のアッセイ方法において、アゴニストまたはアンタゴニストの候補物質を添加した結合緩衝液を用い、候補物質を用いないときのDoc2 α 類似体とMunc13類似体との結合量と、候補物質を添加したときのDoc2 α またはDoc2 α 類似体とMunc13またはMunc13類似体との結合量を比較することにより、Doc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができる。タンパク質の結合量を増加させる物質はアゴニストであり、タンパク質の結合量を減少させる物質はアンタゴニストである、と判定される。

【0056】(カルシウムイオン依存性の神経伝達物質またはホルモン分泌の調節のために用いられるベクター) Doc2 α またはDoc2 α 類似体、あるいはMunc13-1またはMunc13-1類似体をコードするDNA断片を適切なベクターに挿入し、発現ベクターを作製する。この発現ベクターをカルシウムイオン依存性の神経伝達物質またはホルモン分泌を行う細胞に導入し、この細胞内でDoc2 α またはDoc2 α 類似体、あるいはMunc13-1またはMunc13-1類似体を発現させることにより、カルシウムイオン依存性の神経伝達物質またはホルモン分泌を阻害することができる。この方法を用いて、例えば、痴呆症を治療することができる。

【0057】ここで用いられるベクターの例としては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター、Human Immunodeficiency Virus (HIV)ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、およびワクシニアウイルスベクターが挙げられる。

【0058】

【実施例】

実施例1

酵母細胞を用いたtwo-hybrid systemによるDoc2 α に結合するタンパク質のクローニング

文献[17]に記載の方法に基づいて、ヒトDoc2 α のアミノ酸残基番号1~90とLexAのDNA結合領域とを融合タンパク質として発現するプラスミドpBTM116-Doc2 α (1-90アミノ酸)を構築した。

【0059】スクリーニングの対象となるライブラリーは、 1×10^6 個の独立したクローンを持つ、ラット脳由

来cDNAが挿入されているrat brain MATCHMAKER cDNAライブラリー (Clontech社製、CA、USA) を用いた。このライブラリーのプラスミドは、転写活性化ドメインをコードする配列を有している。

【0060】プラスミドpBTM116-Doc2 α (1-90アミノ酸) およびrat brain MATCHMAKER cDNAライブラリーを用いて、文献[18]に記載される方法で酵母L40株 (His要求株) を形質転換した。形質転換された酵母を、ヒスチジンを含まず、2.5mM 3-アミノ1H-1,2,4-トリアゾールを含むSD-LWH培地 (0.67% Yeast nitrogen base w/o amino acid; Difco社製、2% グルコース、300mg/l L-イソロイシン、1500mg/l L-バリン、200mg/l L-アデニンヘミ硫酸塩、200mg/l L-アルギニン塩酸、300mg/l L-リジン塩酸、200mg/l L-メチオニン、500mg/l L-フェニルアラニン、2000mg/l L-トレオニン、300mg/l L-チロシン、200mg/l ウラシル) で作製したプレート上でコロニーを形成し、かつ β -ガラクトシダーゼ活性の発現がみられる陽性クローンを選択した。 β -ガラクトシダーゼ活性の発現については、常法に従ってアッセイを行った。これにより、7個の陽性クローンを得た。この陽性クローンをそれぞれ、Sanger法[19]により、Autoread Sequencing Kit (Pharmacia Biotech社製、Uppsala, Sweden) を使用して配列決定を行なった。その結果、これら7個のクローンは全く同じ配列を持っていることが判明した。このヌクレオチド解析により、最も長いcDNAを持つ陽性クローンは、ラットMunc13-1のアミノ酸残基番号840-1743の領域がGAL4の転写活性化領域の下流の制限酵素EcoRIの部位で融合しているタンパク質を発現することがわかった。

【0061】実施例2

Munc13-1遺伝子全長cDNAの単離

two-hybridスクリーニングで得られたMunc13-1 cDNA断片 (Munc13-1のアミノ酸残基番号840-1743の領域をコードする) を、マルチプライムDNA標識システム (アマシヤム・ジャパン社製) を用いて製造者の説明書に従って³²Pで標識し、これをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション方法を用いてラット脳cDNAライブラリー (rat brain MATCHMAKER cDNAライブラリー; Clontech社製、CA、USA) をスクリーニングした。コロニーハイブリダイゼーション方法は常法[20]に従って以下のように行った。ラット脳cDNAライブラリーを構成している (常法に従って導入してある) 大腸菌DH5 α をLB-プレート (10g トリプトン、5g イーストエキストラクト、10g NaCl、15g アガー/l) に播き、一晚、37℃にて培養した。プレートに生えた大腸菌のコロニーを、ナイロン膜 (Hybond-N⁺、アマシヤム・ジャパン社製) にトランスファーし、その後、SDS処理 (10% SDS)、アルカリ変性 (0.5M NaOH、1.5M NaCl)、および洗浄 (2 \times SSC) (1 \times SSCは0.15M NaCl、0.015M Sodium Citrateよりなる) の操作を行った。洗浄後のナイロン膜は、6 \times SSC、5 \times D

enhardt's solution、0.5% SDS、50%ホルムアミド、100 μ g/mlサケ精子DNAからなるハイブリダイゼーション溶液中で、プローブとして³²Pで標識したMunc13-1 cDNA断片 (430-bp) を用いて、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のナイロン膜を、2 \times SSC+0.5% SDS中で室温にて10分間、1 \times SSC+0.5% SDS中で65℃にて30分間 (2回)、および0.1 \times SSC+0.5% SDS中で65℃にて30分間 (2回) で洗浄した後、X線フィルム (Kodak社製) を感光させ、そのフィルムを現像して、プローブと反応するコロニーを同定した。最終的に1つのcDNAクローンが得られた。cDNAの塩基配列は、Sanger法[18]に従い、Autoread Sequencing Kit (Pharmacia Biotech社製、Uppsala, Sweden) を使用して配列決定した。塩基配列の決定の結果、このクローンは、ラットMunc13-1の全長を含んでいることが明らかとなった。

【0062】実施例3

Munc13-1のDoc2 α 結合領域の決定

クローニングしたラットMunc13-1遺伝子全長cDNAから、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を以下のように用いて図1に示すDNA断片を得た。上記実施例2で得られたクローンから常法に従って得たプラスミドを制限酵素EcoRIで切断したものを鋳型DNAとして用いた。鋳型DNA (ラットMunc13-1 cDNA断片) 0.5ng、Ampli Taq DNA Polymerase 5ユニット、2種のプライマーをそれぞれ50pmol、および10 \times PCR用緩衝液 (100mM Tris-HCl、pH8.3、500mM KCl、15mM MgCl₂、0.1% gelatin) 5 μ lを混和し、さらにdNTP (dATP、dGTP、dTTP、およびdCTP) を最終濃度200mMとなるように加え、滅菌蒸留水で最終的に50 μ lとした。それぞれのDNA断片を得るために用いたプライマーは、DNA断片840-1743については、正プライマー 5'-CATGAATTCCTTCACATCAGTGTGGAGATC-3' (配列番号5)、逆プライマー 5'-CATGAATTCATGGCGCAGCGCGGCACC-3' (配列番号6) ; DNA断片851-1461については、正プライマー 5'-CATGAATTCGAGAAGGTGGCACCTACCATG-3' (配列番号7)、逆プライマー 5'-CATGAATTCCTCAGCTTGGCAGTTTCACCCCTGCC-3' (配列番号8) ; DNA断片851-1336については、正プライマー 5'-CATGAATTCGAGAAAGGTGGCACCTACCATG-3' (配列番号7)、逆プライマー 5'-CATGAATTCCTCAGGTGGCAACACGTGGCTGAG-3' (配列番号9) ; DNA断片851-1208については、正プライマー 5'-CATGAATTCGAGAAGGTGGCACCTACCATG-3' (配列番号7)、逆プライマー 5'-CATGAATTCCTCAGAGTGCACCATGCAGGAAGTC-3' (配列番号10) ; そしてDNA断片1208-1461については、正プライマー 5'-CATGAATTCCTCGAGGGGACAAGAAGGATG-3' (配列番号11)、逆プライマー 5'-CATGAATTCCTCAGCTTGGCAGTTTCACCCCTGCC-3' (配列番号8) である。PCR反応の反応条件は、94℃で5分間加熱後、94℃で1分間、55℃で1分間、および72℃で2分間の反応サイクルを30回繰り返した後、72℃で5分間

であった。PCR反応産物を、2%アガロースゲル (SeaKem Agarose, FMC社製、宝酒造より購入) で泳動した後、エチジウムブロマイド(500ng/ml)で5分間染色して確認し、そしてゲルから単離した。単離された反応産物を、上記のようにEcoRIで消化し、その後、常法に従って酵母発現プラスミドpGAD424 (Clontech社製、CA, USA) の制限酵素EcoRI部位に挿入した。

【0063】Did部分の欠失しているDNA断片1-851+1461-1743については、DNA断片1-851を得るために、正プライマー5'-CATGAATTCATGAAGCGACATGGCCGGCGA-3' (配列番号12) と逆プライマー5'-CATAGCGCTCTTCCCGAAATTGGAGGCAGCG-3' (配列番号13) とのプライマーセットを用い、DNA断片1461-1743を得るために、正プライマー5'-CATAGCGCTAGCCACTCAGACGGGACACAATG-3' (配列番号14) と逆プライマー5'-CATGAATTCCTAGGGCGCAGGCGCGGCACC-3' (配列番号15) とのプライマーセットを用いてそれぞれ上記のようにPCRを行い、それぞれのDNA断片を増幅および単離した。そして単離されたそれぞれの増幅断片をEcoRIおよびEco47IIで消化し、これをEcoRIで消化されたpGAD424と混合し、常法に従って3つのDNAの連結を行い、pGAD424の制限酵素EcoRI部位にDNA断片1-851と1461-1743とが正方向で連結されたものを選択した。

【0064】得られたプラスミドのいずれか1つと先述したpBTM116-Doc2α (1-90アミノ酸) をともに用いて文献[17]に記載されているように酵母L40株を形質転換し、β-ガラクトシダーゼ活性の発現を指標として、Munc13-1のDoc2α結合領域の決定を行った。

【0065】β-ガラクトシダーゼ活性は、文献[21]に従って以下の方法で測定した。Munc13-1遺伝子の種々のDNA断片のいずれか1つを挿入したpGAD424プラスミドとpBTM116-Doc2αプラスミドを用いて形質転換された酵母を、5mlのSD-LW培地 (Yeastnitrogen base w/o amino acid; Difco社製: 2% グルコース、300mg/l L-イソロイシン、1500mg/l L-バリン、200mg/l L-アデニンヘミ硫酸塩、200mg/l L-アルギニン塩酸、200mg/l L-ヒスチジン塩酸、300mg/l L-リジン塩酸、200mg/l L-メチオニン、500mg/l L-フェニルアラニン、2000mg/l L-トレオニン、300mg/l L-チロシン、200mg/l ウラシル) 中で30℃にて一晩培養し、集菌後5mlの0.27%メルカプトエタノールを含むZ緩衝液 (16.1g/lリン酸水素二ナトリウム七水和物、5.5g/lリン酸二水素ナトリウム一水和物、0.75g/l塩化カリウム、0.246g/l硫酸マグネシウム七水和物) 中に懸濁した。この懸濁液のOD₆₀₀を分光光度計にて測定後、500μlを新しいエッペンドルフチューブにとり、液体窒素にて凍結後30℃で融解することを2回繰り返した。これを30℃のインキュベーターに置き、ここに基質溶液 (4mg/ml o-ニトロフェニルガラクトシドを含むZ緩衝液) を100μl加えた。基質溶液添加時を0分として正確に10分後、250μlの1M Na₂CO₃を加えて反応

を停止した。この反応液を14,000rpmで10分間遠心後、その上清のA₄₂₀を分光光度計で測定した。β-ガラクトシダーゼ活性(unit)は以下の式で計算した。

【0066】

$$\text{unit} = (1000 \times A_{420}) / (t \times V \times OD_{600} \times 1 / 0.85)$$

t: 反応時間 (分)

V: 反応に使用した培養液量 (ml)

以上の実験の結果を図1に示す。

【0067】図1は、Munc13-1およびDoc2αの一次構造模式図、酵母two-hybrid systemに用いた各変異体、X-galの発色反応の強さから推定した結合能力、およびβ-ガラクトシダーゼ活性を示す。β-ガラクトシダーゼ活性の強さは、結合能力の強さを示す。Munc13-1およびDoc2αの一次構造模式図のC1はC1領域を、C2はC2領域を示し、結合能の++は強い発色を、+は弱い発色を、-は発色しなかったことを示す。Munc13-1のアミノ酸残基番号851-1461の領域を含むペプチドの結合能が強く、この領域のアミノ酸残基に欠失が存在すると結合能が著しく減少することから、Munc13-1のアミノ酸残基番号851-1461の領域がDoc2αとの結合に必要であることが明らかとなった。従って、この領域をDid (Doc2α-interacting domain of Munc13-1) と命名した。Didの配列を、配列番号1に示す。

【0068】実施例4

Doc2αのMunc13-1結合領域の決定

ヒトDoc2α遺伝子全長cDNAから、以下のようにPCRを用いて図2に示すDNA断片を得た。PCR反応は、鋳型DNA (ヒトDoc2α cDNA断片) 0.5ng、Ampli Taq DNA Polymerase 5ユニット、2種のプライマーをそれぞれ50pmol、および10×PCR用緩衝液5μlを混和し、さらにdNTP (dATP、dGTP、dTTP、およびdCTP) を最終濃度200mMとなるように加え、滅菌蒸留水で最終的に50μlとして行った。それぞれのDNA断片を得るために用いたプライマーは、DNA断片1-90については、正プライマー5'-CATGAATTCATGAGGGCCGCGAGGGCGAT-3' (配列番号16)、逆プライマー5'-CATGAATTCCTCAGCGGTGGCATCATCCGAGTC-3' (配列番号17) ; DNA断片1-78については、正プライマー5'-CATGAATTCATGAGGGCCGCGAGGGCGAT-3' (配列番号16)、逆プライマー5'-CATGAATTCCTCACTCCGCCATCCTCAGGCGT-3' (配列番号18) ; DNA断片1-37については、正プライマー5'-CATGAATTCATGAGGGCCGCGAGGGCGAT-3' (配列番号16)、逆プライマー5'-CATGAATTCCTCAGGGGAAGTAGTCAGAGATCTG-3' (配列番号19) ; DNA断片9-37については、正プライマー5'-CATGAATTCATGACCATCAACATCCAGGAG-3' (配列番号20)、逆プライマー5'-CATGAATTCCTCAGGGGAAGTAGTCAGAGATCTG-3' (配列番号19) ; DNA断片13-37については、正プライマー5'-CATGAATTCATCCAGGAGCACATGGCCATC-3' (配列番号21)、逆プライマー5'-CATGAATTCAGGGGAAGTAGTCAGAGATCTG-3' (配列番号19) ; DNA

断片 9-32 については、正プライマー 5'-CATGAATTCATGACCATCAACATCCAGGAG-3' (配列番号 20)、逆プライマー 5'-CATGAATTCTCAGATCTGGCGGATGGGCGGAT-3' (配列番号 22) ; DNA断片 19-37 については、正プライマー 5'-CATGAATTCATCAACGTGTGCCCCGGGCCATC-3' (配列番号 23)、逆プライマー 5'-CATGAATTCTCAGGGAAGTAGTCAGAGATCTG-3' (配列番号 19) ; そして DNA断片 90-400 については、正プライマー 5'-CATGAATTC AAGGCAAGCTGGAGTTTGAC-3' (配列番号 24)、逆プライマー 5'-CATGAATTCTCAGGCTGAGGACAGAGCCCC-3' (配列番号 25) である。PCR の反応条件は、94℃で 5 分間加熱後、94℃で 1 分間、55℃で 1 分間、および 72℃で 2 分間の反応サイクルを 30 回繰り返した後、72℃で 5 分間であった。反応産物は、2% アガロースゲルで泳動した後、エチジウムブロマイド (500ng/ml) で 5 分間染色して確認し、そしてゲルから単離した。単離された反応産物を EcoRI で消化し、その後、常法に従って酵母発現プラスミド pBTM116 の制限酵素 EcoRI 部位に挿入した。得られたプラスミドのいずれか 1 つと、先述した pGAD424 の EcoRI 部位にラット Munc13-1-Did (これは、Munc13-1 の 851~1461 位のアミノ酸配列を有するペプチドである) を挿入したプラスミドとをともに用いて、文献 [18] に記載されているように酵母 L40 株を形質転換し、 β -ガラクトシダーゼ活性の発現を指標として、Doc2 α の Munc13-1 との結合領域の決定をおこなった。 β -ガラクトシダーゼ活性は、上記の実施例 3 と同じ方法を用いて測定を行った。

【0069】 以上の実験の結果を図 2 に示す。図 2 は、Munc13-1 および Doc2 α の一次構造模式図、酵母 two-hybrid system に用いた各変異体、X-gal の発色反応の強さから推定した結合能力、および β -ガラクトシダーゼ活性を示す。Munc13-1 および Doc2 α の一次構造模式図の C1 は C1 領域を、C2 は C2 領域を示し、結合能の ++ は強い発色を、+ は弱い発色を、- は発色しなかったことを示す。Doc2 α のアミノ酸残基番号 13-37 の領域を含むペプチドの結合能が強く、この領域のアミノ酸残基に欠失が存在すると結合能が著しく減少することから、Doc2 α のアミノ酸残基番号 13-37 の領域が Munc13-1 との結合に必要であることが明らかとなった。従って、この領域を Mid (Munc13-1-interacting domain of Doc2 α) と命名した。Mid の配列を、配列番号 2 に示す。

【0070】 実施例 5

Doc2 ファミリータンパク質と Munc13 ファミリータンパク質との結合

ヒト Doc2 β 遺伝子全長 cDNA を鋳型として以下のように PCR 反応を行い、ヒト Doc2 β の C2 領域の上流部分であるアミノ酸残基番号 1-122 の領域をコードする DNA 断片を得た。鋳型 DNA (ヒト Doc2 β cDNA 断片) 0.5ng、Ampli Taq DNA Polymerase 5 ユニット、2 種のプライマーをそれぞれ 50pmol、および 10 \times PCR 用緩衝液 5 μ l を混和し、さら

に dNTP (dATP、dGTP、dTTP、および dCTP) を最終濃度 200mM となるように加え、滅菌蒸留水で最終的に 50 μ l とした。用いたプライマーは、正方向プライマー 5'-CATGAATTCATGACCTCCGGCGGCGGGGAG-3' (配列番号 26)、および逆方向プライマー 5'-CATGAATTCTCAGGCAGTGCAGTGTCCGACTCGT-3' (配列番号 27) である。PCR 反応の反応条件は、94℃で 5 分間加熱後、94℃で 1 分間、55℃で 1 分間、および 72℃で 2 分間の反応サイクルを 30 回繰り返した後、72℃で 5 分間であった。PCR 反応産物を、2% アガロースゲル泳動した後、エチジウムブロマイド (500ng/ml) で 5 分間染色して確認し、そしてゲルから単離した。単離された反応産物を EcoRI で消化し、その後、常法に従って酵母発現プラスミド pBTM116 の制限酵素 EcoRI 部位に挿入した。

【0071】 一方、ラット Munc13-2 のラット Munc13-1 と類似性が高い領域 (アミノ酸残基番号 1110-1695) をコードする DNA 断片を、以下のように PCR を用いてラット脳 cDNA ライブラリー (rat brain MATCHMAKER cDNA ライブラリー; Clontech 社製、CA、USA) より得た。鋳型 DNA (ラット脳 cDNA ライブラリー) 0.5mg、Ampli Taq DNA Polymerase 5 ユニット、オリゴヌクレオチドをそれぞれ 50pmol、および 10 \times PCR 用緩衝液 5 μ l を混和し、さらに dNTP (dATP、dGTP、dTTP、および dCTP) を最終濃度 200mM となるように加え、滅菌蒸留水で最終的に 50 μ l とした。用いたプライマーは、正方向プライマー 5'-CATGAATTCGACGATGCATGGAAGGTGTAC-3' (配列番号 28)、および逆方向プライマー 5'-CATGAATTCTCAGGTGCCTGTCTGGTCAATGAG-3' (配列番号 29) である。PCR 反応の反応条件は、94℃で 5 分間加熱後、94℃で 1 分間、55℃で 1 分間、および 72℃で 2 分間の反応サイクルを 30 回繰り返した後、72℃で 5 分間であった。PCR 反応産物を、2% アガロースゲルで泳動した後、エチジウムブロマイド (500ng/ml) で 5 分間染色して確認し、そして単離した。単離された反応産物を、DNA 配列決定して確認し、上記のように EcoRI で消化し、その後、常法に従って酵母発現プラスミド pGAD424 の制限酵素 EcoRI 部位に挿入した。

【0072】 このようにして得られた 2 つのプラスミド、ならびに上記のプラスミド pBTM116-Doc2 α (1-90 アミノ酸) および pGAD424-Munc13-1-Did を、図 3 に示す組み合わせで用いて、文献 [17] の方法で酵母 L40 株を形質転換し、 β -ガラクトシダーゼ活性の発現を指標として、Doc2 α および Doc2 β に対する Munc13-1 および Munc13-2 の結合能を調べた。 β -ガラクトシダーゼ活性は、上記の実施例 3 と同じ方法を用いて測定を行った。

【0073】 結果を図 3 に示す。図 3 は、Munc13-1、Munc13-1、Doc2 α および Doc2 β の一次構造模式図、酵母 two-hybrid system に用いた各変異体、X-gal の発色反応の強さから推定した結合能、および β -ガラクトシダーゼ活性を示す。Munc13-1、Munc13-1、Doc2 α および Doc2 β の一次構造模式図の C1 は C1 領域を、C2 は C2 領域

を示し、結合能の++は強い発色を、+は弱い発色を示す。Doc2 α またはDoc2 β と、Munc13-1またはMunc13-2とのいずれの組み合わせでも結合がみられたことから、Doc2 α およびDoc2 β は共に、Munc13-1およびMunc13-2と結合することが明らかになった。これにより、Doc2ファミリーのタンパク質とMunc13ファミリーのタンパク質とが結合することが明らかになった。

【0074】Doc2 α のMid領域(アミノ酸残基13位~37位)はDoc2 β のMid領域(アミノ酸残基14位~38位)と92%の類似性を有しており、Munc13-1のDid領域(アミノ酸残基851位~1461位)はMunc13-2のDid領域(アミノ酸残基1110位~1695位)と81%の類似性を有している。この領域は、それぞれのタンパク質にとって、他のタンパク質と類似性がない特異的な領域であるので、両者の結合も特異的であると考えられる。

【0075】実施例6

大腸菌におけるDoc2 α およびMunc13-1タンパク質の発現ならびに発現されたタンパク質の精製

Doc2 α のアミノ酸残基番号1から90に相当する部分を発現するベクターpGEX-2T-Doc2-N、およびMunc13-1のDid領域(アミノ酸残基番号851から1461)を発現するベクターpGEX-2T-Munc13-1-Didを、以下の方法で構築した。まず、Doc2 α についてはpSPORT1ベクターを鋳型にして、Munc13-1については実施例2で得られたMunc13-1遺伝子全長を含むクローンから単離されたプラスミドを鋳型にして、PCR反応を行うことによりそれぞれのアミノ酸配列をコードするDNA断片を得た。pSPORT1ベクターには、ヒト脳からクローニングしたDoc2のcDNAの全長1.7kbが組み込まれており、このベクターは、Gibco-BRL社から入手可能である。鋳型DNA 0.5mg、Ampli Taq DNA Polymerase 5ユニット、2種のプライマーをそれぞれ100pmol、および10 \times PCR用緩衝液5 μ lを混合し、さらにdNTP(dATP、dGTP、dTTP、およびdCTP)を最終濃度200mMとなるように加え、滅菌蒸留水で最終的に50 μ lとした。それぞれ用いたプライマーは、Doc2 α については、正プライマー5'-CATGGATCCATGAGGGCCGCGAGGGCGAT-3'

(配列番号30)；逆プライマー5'-CATGGATCCTCAGGCGTGCGCATCATCCGAGTC-3'(配列番号31)、Munc13-1については、正プライマー5'-CATGGATCCGAGAAGGTGGCACCCATCCATG-3'(配列番号32)；逆プライマー5'-CATGGATCCTCAGCTTGGCAGTTTACCCTGCC-3'(配列番号33)であった。PCR反応の反応条件は、94 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、55 $^{\circ}$ Cで1分間、および72 $^{\circ}$ Cで2分間の反応サイクルを30回繰り返してであった。PCR反応産物を、2%アガロースゲルで泳動した後、エチジウムブロマ이드(500ng/ml)で5分間染色して確認し、そしてゲルから単離した。単離された反応産物を、製造者の説明書に従ってBamHIで消化した。次に、消化して得られたそれぞれのDNA断片を、常法に従ってpGEX-2T(Pharmacia社製)のBamHI部位に挿入した。このようにして、pGEX-2

T-Doc2-NおよびpGEX-2T-Munc13-1-Didが得られた。

【0076】pGEX-2T-Doc2-NまたはpGEX-2T-Munc13-1-Didを用いて、常法に従って大腸菌DH5 α 株を形質転換した。得られた形質転換株を、それぞれ、LB培地(1リットルあたり10gトリプトン、5gイーストエキストラクトおよび10g NaCl)中37 $^{\circ}$ Cで培養し、次いで0.1mM IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)を加えた後、30 $^{\circ}$ Cで3時間培養することにより、タンパク質誘導を行った。タンパク質誘導後の培養物を、それぞれ、10,000 \times gで20分間遠心分離することにより集菌し、上清を捨て、細菌ペレットを10mlのPBS(-)(8g NaCl、0.2g KCl、2.9g Na₂HPO₄、0.2g KH₂PO₄/1L蒸留水、pH7.4)に懸濁させた。細菌懸濁液に超音波処理を行って細胞を破碎し、次いで100,000 \times gで、1時間、4 $^{\circ}$ Cの条件で遠心分離した。得られた上清をそれぞれグルタチオンセファロースカラム(Pharmacia社製)にかけ、カラムをPBSで洗浄し、次いで溶出緩衝液(20mMグルタチオン、50mM Tris-HCl、pH8.0)を用いて溶出することにより、融合タンパク質を精製した。

【0077】得られたそれぞれの形質転換株は、それぞれのタンパク質をグルタチオントランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現した。

【0078】実施例7

Doc2 α とMunc13-1の試験管内での結合

まず、pGEM-1プラスミド(Promega社製)にHAタグ(アミノ酸配列、Met-Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala)をコードするDNA断片を挿入したプラスミドpGEM-HAを作製した。これは、HAタグを含む化学合成した、互いに相補的な2つのオリゴヌクレオチド5'-AATTCGGTACGATGTACCCATACGACGTCGCCAGACTACGCTGGTACCG-3'(配列番号34)および5'-GATCCGGTACCAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGTACATCGTACCG-3'(配列番号35)をアニールさせた後、制限酵素EcoRIおよびBamHIで切断したpGEM-1と正方向で連結することにより作製した。さらにpBluescript(Stratagene社製)プラスミドにmycタグ(アミノ酸配列、Met-Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Gln-Glu-Asp-Leu)をコードするDNA断片を挿入したプラスミドpBluescript-mycを作製した。これは、mycタグを含む化学合成した、互いに相補的な2つのオリゴヌクレオチド5'-GATCGATGGAGCAGAAGCTTATCAGCGAGGAGGACCTGG-3'(配列番号36)および5'-GATCCAGGTCTCTCGCTGATAAGCTTCTGCTCCATC-3'(配列番号37)をアニールさせた後、制限酵素BamHIで切断したpBluescriptと正方向で連結することにより作製した。

【0079】次に、ヒトDoc2 α のアミノ酸残基1位~400位、1位~241位、および90位~400位のアミノ酸配列、ならびにラットMunc13-1のアミノ酸残基1位~1743位、851位~1461位、および1位~851位+1461位~1743位のアミノ酸配列をコードするDNA断片を、PCR反応を行うことにより得た。鋳型DNA 0.5ng、Ampli Taq DNA P

olymerease 5ユニット、2種のプライマーをそれぞれ50p mol、および10×PCR用緩衝液5μlと混和し、さらにdNTP (dATP、dGTP、dTTP、dCTP)を最終濃度200mMとなるように加え、滅菌蒸留水で最終的に50μlとした。鋳型DNAは、ヒトDoc2αについては、ヒトDoc2α 全長cDNAを用い、ラットMunc13-1については、ラットMunc13-1全長cDNAを用いた。プライマーは、ヒトDoc2αのアミノ酸残基1位~400位については、正プライマー5'-CATGGATCCATGAGGGGCGCAGGGGCGAT-3' (配列番号38)、逆プライマー5'-CATGGATCCTCAGGCTGAGGACAGAGCCCC-3' (配列番号39)；ヒトDoc2αの1位~241位については、正プライマー5'-CATGGATCCATGAGGGGCGCAGGGGCGAT-3' (配列番号38)、逆プライマー5'-CATGGATCCTCACTGCTCCAGTCCTTCAGATA-3' (配列番号40)；ヒトDoc2αの90位~400位については、正プライマー5'-CATGGATCCCTAGGCAAGCTGGAGTTTGAC-3' (配列番号41)、逆プライマー5'-CATGGATCCTCAGGCTGAGGACAGAGCCCC-3' (配列番号39)；ラットMunc13-1のアミノ酸残基1位~1743位については、正プライマー5'-CATGGATCCATGAAGCGACATGGCGGCGA-3' (配列番号42)、逆プライマー5'-CATGGATCCCTAGGGGCGCAGGGGCGGCACC-3' (配列番号43)；およびラットMunc13-1の851位~1461位については、正プライマー5'-CATGGATCCGAGAAGGTGGCACCTACCATG-3' (配列番号44)、逆プライマー5'-CATGGATCCTCAGCTTGCGAGTTTACCCTGCC-3' (配列番号45)を用いた。PCR反応の反応条件は、94℃で5分間加熱後、94℃で1分間、55℃で1分間、そして72℃で2分間の反応サイクルを30回繰り返した後、72℃で5分間であった。得られた反応産物を、それぞれ2%アガロースゲルで泳動した後、エチジウムブロマイド(500ng/ml)で5分間染色して確認し、そしてゲルから単離した。単離された反応産物を、Doc2αについては上記のようにBamHIで消化した後、pGEM-HAのBamHI部位に、Munc13-1については上記のようにBamHIで消化した後、pBluescript-mycのBamHI部位に挿入した。この部位はT7プロモーターの下流であり、この部位に挿入することにより、T7 RNAポリメラーゼによってそれぞれのDNA断片からmRNAが合成される。

【0080】Did部分の欠失しているMunc13-1のアミノ酸残基1-851+1461-1743をコードするDNA断片については、アミノ酸残基1-851をコードするDNA断片を得るために、正プライマー5'-CATGGATCCATGAAGCGACATGGCGGCGA-3' (配列番号42)と逆プライマー5'-CATAGCGCTCTTCCCGAAATTGGAGGAGCG-3' (配列番号13)とのプライマーセットを用い、アミノ酸残基1461-1743をコードするDNA断片を得るために、正プライマー5'-CATAGCGCGTAGCCACTCAGACGGGACACAAATG-3' (配列番号14)と逆プライマー5'-CATGGATCCCTAGGGGCGCAGGGGCGGCACC-3' (配列番号43)とのプライマーセットを用いてそれぞれ上記のようにPCRを行い、それぞれのDNA断片を増幅および単離した。そして単離されたそれぞれの増幅断

片をBamHIおよびEco47IIIで消化し、これをBamHIで消化されたpBluescript-mycと混合し、常法に従って3つのDNAの連結を行い、pBluescript-mycの制限酵素BamHI部位にDNA断片1-851と1461-1743とが正方向で連結されたものを選択した。

【0081】得られたこれらのプラスミドを鋳型として、³⁵S-メチオニン存在下で、TNT T7 coupled Reticulocyte Lysate System (Promega社製)を製造者の説明書に従って用いてin vitro translationにより³⁵Sで標識されたタンパク質を合成した。

【0082】Doc2αとMunc13-1との試験管内での結合については、まず、実施例6で得られたGSTとMunc13-1との融合タンパク質2μgを、結合緩衝液(150mM NaCl、50mM HEPES、pH7.4、および1mM EGTA)に溶かし、グルタチオンセファロースカラム(Pharmacia社製)に注ぎ、4℃で1時間反応させることによりカラムに結合させた。次いで、上記³⁵Sで標識されたDoc2αの変異体のいずれか1つ(2μg)を、結合緩衝液(150mM NaCl、50mM HEPES、pH7.4、および1mM EGTA)に溶解し、カラムに加え、そして4℃で5時間反応させた。次いで、カラムを結合緩衝液で4回洗浄し、そして100μlの溶出緩衝液を用いて結合したタンパク質を溶出した。得られた溶出物に、1mgのSDSを添加し、100℃で5分間反応させSDS化した。SDS化したタンパク質を、12%アクリルアミドゲルを用いるSDS-PAGEにアプライし、泳動後、ゲルを乾燥し、X線フィルム(Kodak社製)を感光させ、現像して出てくるバンドを解析した。

【0083】結果を図4に示す。図4は、Doc2αの一次構造模式図、in vitro translationにより作製した³⁵S標識Doc2αとその変異体(1から3)、およびGST-Munc13-Didとの結合反応後に得られた溶出物を電気泳動したゲルのオートラジオグラフィーを示す。矢印は、GST-Munc13-Didに結合したDoc2αとその変異体の位置を示す。また、オートラジオグラフィーの右側に示した数字は、タンパク質の分子量(単位はダルトン、Kはキロ)を示す。この結果、Doc2αの13位~37位の領域を有するタンパク質(1および2)は、試験管内でもMunc13-1のDid領域と結合することが明らかになった。

【0084】次に、実施例6で得られたGSTとDoc2αとの融合タンパク質(2μg)をグルタチオンセファロースカラム(Pharmacia社製)に結合させた。次いで、上記³⁵Sで標識されたMunc13-1の変異体のいずれか1つ(2μg)を、Doc2αの変異体について記載したのと同様にして、カラムに固定化されたDoc2αと結合したタンパク質の溶出物を得、SDS-PAGEを行い、そしてバンドの解析を行った。

【0085】結果を図5に示す。図5は、Munc13-1の一次構造模式図、in vitro translationにより作製した³⁵S標識Munc13-1とその変異体(1から3)、およびGST-Doc2α(1-90)との結合反応後に得られた溶出物を電気泳

動したゲルのオートラジオグラフィーを示す。矢印は、GST-Doc2 α (1-90)に結合したMunc13-1とその変異体の位置を示す。また、オートラジオグラフィーの右側に示した数字はタンパク質の分子量(単位、ダルトン、Kはキロ)を示す。この結果、Munc13のDid領域を含むタンパク質(1および2)は、試験管内でもDoc2 α のMid領域を含むアミノ酸残基番号1-90の領域と結合することが明らかにになった。

【0086】試験管内でもDoc2 α はMunc13-1と結合することが明らかとなったことから、Doc2 α とMunc13-1との結合を阻害または促進する物質の試験管内での検索が可能となった。

【0087】実施例8

PC12細胞でのDoc2 α とMunc13-1との結合

ラット副腎褐色細胞腫由来であるPC12細胞(PC12 pheochromocytoma cell line; 文献30を参照のこと)を、35mm ϕ dishに 5×10^5 となるように播き、10%牛胎児血清および5%馬血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地中で37℃で18時間培養した。培養後のPC12細胞を、T7RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス(L0-T7株)(東京都臨床研小原道法先生より贈与された)で30分間感染させ、次いで、上記実施例7で作製した、ヒトDoc2 α のアミノ酸残基1位~400位をコードするcDNA断片がpGEM-HAに挿入されたプラスミドおよびラットMunc13-1のアミノ酸残基1位~1743位をコードするcDNAがpBluescript-mycに挿入されたプラスミドを、リポフェクトアミン(Gibco BRL社製)を用い、製造者の説明書に従ってトランスフェクションを行うことにより導入した。

【0088】トランスフェクション後、細胞をさらに5時間培養した。分泌刺激を与えた場合と、与えない場合のDoc2 α タンパク質とMunc13-1タンパク質の発現量を比較するために、高濃度カリウム処理またはTPA処理を行い、無処理のものをコントロールとした。分泌刺激を与える場合は、培養後のPC12細胞を、PSS (140mM NaCl、4.7mM KCl、2.5mM CaCl₂、1.2mM MgSO₄、1.2mM KH₂PO₄、20mM HEPES、pH7.4、および11mM glucose)に懸濁して洗浄し、遠心分離を行い、ペレットを、60mM KClおよび85mM NaClを含むPSS(高濃度カリウム処理の場合)または100nMのTPA(12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate)を含むPSSに懸濁し、37℃で、10分間処理をおこなった。処理後に遠心分離して細胞を回収し、細胞を洗浄し、500 μ lの溶解緩衝液(20mM Tris/HCl at pH7.5、150mM NaCl、1% NP-40および10mM p-amidino-phenylmethanesulfonyl fluoride)に懸濁して30分間放置することにより細胞を溶解し、得られた細胞溶解液を100,000 \times gで1時間遠心分離し、上清を得た。

【0089】この上清を細胞質画分とした。この細胞質画分(500 μ l)に3 μ gの抗HAモノクローナル抗体(Berkeley Antibody社製)および20 μ lのプロテインA-セファロース(Pharmacia社製)を加え、4℃で4時間反応

させることにより、免疫沈降を行った。反応後の細胞質画分を、1,000 \times gで1分間遠心分離し、プロテインA-セファロースに結合したタンパク質のペレットを得た。このペレットに1mgのSDSを含むSDS溶液100 μ lを加えて100℃で5分間加熱することにより、プロテインA-セファロースに結合したタンパク質をSDS化すると共にプロテインA-セファロースから遊離させた。SDS化後に溶液を1,000 \times gで1分間遠心分離し、SDS化したタンパク質を含む上清を得た。この上清を、12%ポリアクリルアミドゲルを用いるSDS-PAGEにかけ、ナイロン膜(商品名Immobilon, Millipore社製)に電気的に移した。この膜を5%スキムミルク(Difco Laboratories社製)の入ったPBS緩衝液中でブロッキングを行った後、1000倍希釈の抗mycモノクローナル抗体(ベーリンガー・マンハイム社製)および5%スキムミルクを添加したPBS緩衝液中で、室温、1時間反応させた。その後、1% Tween20の入ったPBSを用いて、室温で3回洗浄した。次に、5%スキムミルクおよび1000倍希釈したhorseradish peroxidaseと結合した抗マウスIgGグロブリンヒツジポリクローナル抗体(アマシヤム・ジャパン社製)を添加したPBS緩衝液中で、室温にて1時間反応させた。その後、1% tween20の入ったPBSを用いて、室温で3回洗浄した。洗浄後、ECLウエスタンブロットリング検出システム(アマシヤム・ジャパン社製)を製造者の説明書に従って用いて発色反応を行い、X線フィルム(Kodak社製)を感光させ、現像して出てくるバンドを検出した。このバンドは、HAタグとDoc2 α の融合タンパク質に結合したmycタグとMunc13-1の融合タンパク質を示す。

【0090】結果を図6に示す。図6は、抗HA抗体を用いた免疫沈降産物を、抗myc抗体でウエスタンブロット解析した結果であり、1は分泌刺激していないPC12細胞、2は高濃度カリウム刺激により分泌刺激したPC12細胞、3はTPA処理により分泌刺激したPC12細胞を示す。左側の矢印は、Doc2 α に結合したMunc13-1の位置を示す。また、右側の数字はタンパク質の分子量(単位、ダルトン、Kはキロ)を示す。これにより、Doc2 α はMunc13-1とPC12細胞中でも結合することが示された。また、その結合は高濃度カリウムイオンあるいはTPA処理により促進されることが明らかになった。高濃度カリウムイオン刺激などにより分泌を起こさせると細胞内カルシウムイオン上昇とジアシルグリセロールの産生が誘導されるという従来の報告から[22]、ジアシルグリセロールと同様の作用を示すTPAで誘導されるDoc2 α とMunc13-1の結合は、カルシウムイオン依存性の分泌に重要な働きをしていると考えられる。したがって、Doc2 α とMunc13-1の結合がカルシウムイオン依存性の分泌に働いていることが予想される。

【0091】実施例9

PC12細胞での成長ホルモンの分泌に対するDoc2 α -MidまたはMunc13-1-Didの影響

ヒトDoc2 α -MidをコードするDNA断片が発現ベクターpEF-Bosに挿入されたプラスミドは以下のようにして構築した。実施例4で得られたDoc2 α -Mid（これは、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列を有するペプチドである）をコードするDNAがpBTM116に挿入されているプラスミドを制限酵素XbaIで切断し、Doc2 α -MidをコードするDNA断片を単離し、これを発現ベクターpEF-BosのXbaI部位に正方向に挿入して連結する。

【0092】ラットMunc13-1-DidをコードするDNA断片が発現ベクターpEF-Bosに挿入されたプラスミドは以下のようにして構築した。実施例4で得られたMunc13-1-Did（アミノ酸残基番号851から1461）をコードするDNAがpGAD424に挿入されたプラスミドを制限酵素XbaIで切断し、Munc13-1-MidをコードするDNA断片を単離し、これを発現ベクターpEF-BosのXbaI部位に正方向に挿入して連結する。

【0093】PC12細胞を35mm dishで 5×10^5 となるように播き、10%牛胎児血清および5%馬血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地中で18時間培養した。その後、ヒトDoc2 α -Mid（アミノ酸残基番号13から37）またはラットMunc13-1-Did（アミノ酸残基番号851から1461）をコードするDNA断片を発現ベクターpEF-Bosに挿入したプラスミドのいずれか一方を、ヒト成長ホルモンを発現するプラスミドpXGH5と共に15 μ gのリポフェクトアミン（Gibco BRL社製）と1ml opti-MEM（Gibco BRL社製）を製造者の説明書に従って用いて、トランスフェクションした。トランスフェクションに用いたプラスミドの量は、それぞれ2 μ gである。いずれかのトランスフェクション細胞を4時間培養した後、培地交換を行い10%牛胎児血清および5%馬血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地中で48時間培養した。分泌刺激を与えた場合と、与えない場合のDoc2 α タンパク質とMunc13-1タンパク質の発現量を比較するために、上記実施例8と同様に高濃度カリウム処理またはTPA処理を行い、無処理のものをコントロールとした。分泌刺激後、細胞ペレットを回収し、500 μ lの1% Triton-X-100含有PSSに懸濁して細胞内に残存する成長ホルモンを溶解した。培養上清および細胞溶解物に含まれる成長ホルモンの量を、抗ヒト成長ホルモン抗体を用いるラジオイムノアッセイ用の測定キット（Nichols Institute社製）を製造者の使用説明書に基づいて用いて測定した。得られた測定値をもとにして、産生された全成長ホルモン量に占める分泌された成長ホルモン量の割合を決定した。

【0094】結果を図7に示す。図7は、プラスミドを導入していないコントロールPC12細胞、Doc2 α -Midを発現させたPC12細胞および、Munc13-1-Didを発現させたPC12細胞を、それぞれ低濃度カリウムイオン（low K⁺）、高濃度カリウムイオン（high K⁺）、およびTPA処理した時の、全成長ホルモン量に対する分泌されたホルモン量の割合を百分率で示す。Doc2 α -MidとMunc13-1-Didは、い

ずれもPC12細胞での成長ホルモンの分泌に対して抑制作用を示した。ヒト成長ホルモンをPC12細胞で発現させると、ヒト成長ホルモンは、神経伝達物質の1つであるノルエピネフリンを含む分泌顆粒に輸送され、カルシウムイオン依存性の分泌によりノルエピネフリンとともに分泌されることが知られている。従って、成長ホルモンの分泌量は、カルシウムイオン依存性の分泌量を反映している。この結果から、Munc13-1のDidおよびDoc2 α のMidがいずれもカルシウム依存性分泌に影響をおよぼすことが明らかになった。

【0095】

【発明の効果】本発明によれば、Doc2 α とMunc13-1との結合のアゴニストまたはアンタゴニストの候補物質のスクリーニング方法；神経伝達物質またはホルモンのカルシウムイオン依存性の分泌を阻害する方法；Doc2 α 類似体とキャリアタンパク質との融合タンパク質などが提供される。

【0096】本発明でDoc2 α とMunc13とが結合することから、神経細胞または内分泌細胞における、神経伝達物質またはホルモンの、カルシウムイオン依存性の分泌機構の解明に新たな展開がもたらされる。

【0097】Doc2 α とMunc13は、いずれもC2領域を有しており、この領域にカルシウムイオンが結合することによりカルシウムイオンセンサーとして機能していると考えられる。PC12細胞を用いた成長ホルモンの分泌の実験から、Doc2 α とMunc13との結合がカルシウムイオン依存性分泌を調節していると予想される。以上のことから、Doc2 α とMunc13との結合を阻害する物質（アンタゴニスト）または促進する物質（アゴニスト）は、神経細胞における神経伝達物質放出機能を制御するために使用し得る。Doc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストは、神経伝達物質またはカルシウムイオンが関与している神経疾患の治療薬（例えば、抗痴呆薬、抗てんかん薬、向精神薬、あるいは脳代謝改善薬）として使用することが可能である。

【0098】さらに、Doc2 α -Midはわずか25アミノ酸からなっているので、この25アミノ酸を化学合成して樹脂または96ウェルプレートに結合させ、次いでアゴニストまたはアンタゴニストの候補物質と共に、組み換え体タンパク質として作製、精製、および標識したMunc13-Didを加え、樹脂または96ウェルプレートに結合した標識を測定し、Munc13-DidとDoc2 α -Midとの結合が促進または阻害されたか否かを決定することにより、アゴニストおよびアンタゴニストを迅速にスクリーニングすることが可能である。

【0099】（参考文献）

1. Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Komuro, R., Ohtsuka, T., Maeda, M., Suzuki, H., Igarashi, H., and Takai, Y., Doc2: a novel brain protein having two repeated C2-like domains. Biochemical & Biophysical Res

- earch Communications, 1995. 206: p. 439-448.
2. 特開平8-16385
 3. Orita, S., Sasaki, T., Komuro, R., Sakaguchi, G., Maeda, M., Igarashi, H., and Takai, Y., Doc2 enhances Ca²⁺-dependent exocytosis from PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. 271: p. 7257-7260.
 4. Sakaguchi, G., Orita, S., Maeda, M., Igarashi, H., and Takai, Y., Molecular cloning of an isoform of Doc2 having two C2-like domains. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1995. 217 p. 1053-1061.
 5. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., and Nishizuka, Y., Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1979. 91: p. 1218-1224.
 5. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., and Nishizuka, Y., Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1979. 91: p. 1218-1224.
 6. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., and Nishizuka, Y., Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 1979. 254: p. 3692-3695.
 7. Nishizuka, Y., The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 1988. 334: p. 661-665
 8. Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N., and Knopf, J. L., *Cell*, 1991. 65: p. 1043-1051.
 9. Stahl, M. L., Ferenz, C. R., Kelleher, K. L., Kriz, R. W., and Knopf, J. L., Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature*, 1988. 332: p. 269-272.
 10. Maruyama, I. N. and Brenner, S., A phorbol ester/diacylglycerol-binding protein encoded by the unc-13 gene of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991. 88: p. 5729-5733.
 11. Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y., and Sudhof, T. C., Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270: p. 25273-25280.
 12. Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., and Sudhof, T. C., Phospholipid binding by a synaptic

- c vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, 1990. 345: p. 260-263.
13. Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M., and Takai, Y., Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Molecular & Cellular Biology*, 1993. 13: p. 2061-2068.
 14. Ahmed, S., Maruyama, I. N., Kozma, R., Lee, J., Brenner, S., and Lim, L., The *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene product is a phospholipid-dependent high-affinity phorbol ester receptor. *Biochemical Journal*, 1992. 287(Pt 3): p. 995-999.
 15. Kazanietz, M. G., Lewin, N. E., Bruns, J. D., and Blumberg, P. M., Characterization of the cysteine-rich region of the *Caenorhabditis elegans* protein Unc-13 as a high affinity phorbol ester receptor. *Analysis of ligand-binding interactions, lipid cofactor requirements, and inhibitor sensitivity. Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270(18): p. 10777-10783.
 16. Hosono, R. and Kamiya, Y. *Neuroscience Letter* 1991. 128:243-244
 17. Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., and Cooper, J. A., Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, 1993. 74 p. 205-214.
 18. Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H., Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research*, 1992. 20: p. 1425.
 19. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. 74: p. 5463-5467.
 20. Sambrook, F., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. 1989, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 21. Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P., *Methods in Yeast Genetics*. 1990, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 22. Wakade, T. D., Bhawe, S. V., Bhawe, A. S., Malhotra, R. K., and Wakade, A. R., *Journal of Biological Chemistry*, 1991. 266: p. 6424-6428.
- 【0100】
 【配列表】
 配列番号：1
 配列の長さ：611
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ラット

* 他の情報：この配列は、Munc13-1の851～1461位のアミノ酸配列に相当する

*

配列：

Glu	Lys	Val	Ala	Pro	Tyr	His	Val	Gln	Tyr	Thr	Cys	Leu	His	Glu	Asn
1				5					10					15	
Leu	Phe	His	Phe	Val	Thr	Asp	Val	Gln	Asn	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Ile
				20					25					30	
Pro	Asp	Ala	Lys	Gly	Asp	Asp	Ala	Trp	Lys	Val	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Thr
				35					40					45	
Ala	Gln	Glu	Ile	Val	Asp	Glu	Phe	Ala	Met	Arg	Tyr	Gly	Val	Glu	Ser
				50					55					60	
Ile	Tyr	Gln	Ala	Met	Thr	His	Phe	Ala	Cys	Leu	Ser	Ser	Lys	Tyr	Met
				65					70					75	
Cys	Pro	Gly	Val	Pro	Ala	Val	Met	Ser	Thr	Leu	Leu	Ala	Asn	Ile	Asn
									85					90	
Ala	Tyr	Tyr	Ala	His	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Asn	Val	Ser	Ala	Ser	Asp
									100					105	
Arg	Phe	Ala	Ala	Ser	Asn	Phe	Gly	Lys	Glu	Arg	Phe	Val	Lys	Leu	Leu
									115					120	
Asp	Gln	Leu	His	Asn	Ser	Leu	Arg	Ile	Asp	Leu	Ser	Met	Tyr	Arg	Asn
									130					135	
Asn	Phe	Pro	Ala	Ser	Ser	Pro	Glu	Arg	Leu	Gln	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr
									145					150	
Val	Asp	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Thr	Phe	Phe	Arg	Met	Lys	Val	Gln	Glu
									165					170	
Leu	Gln	Ser	Pro	Pro	Arg	Ala	Ser	Gln	Val	Val	Lys	Asp	Cys	Val	Lys
									180					185	
Ala	Cys	Leu	Asn	Ser	Thr	Tyr	Glu	Tyr	Ile	Phe	Asn	Asn	Cys	His	Glu
									195					200	
Leu	Tyr	Gly	Arg	Glu	Tyr	Gln	Thr	Asp	Pro	Ala	Lys	Lys	Gly	Glu	Val
									210					215	
Pro	Pro	Glu	Glu	Gln	Gly	Pro	Ser	Ile	Lys	Asn	Leu	Asp	Phe	Trp	Ser
									225					230	
Lys	Leu	Ile	Thr	Leu	Ile	Val	Ser	Ile	Ile	Glu	Glu	Asp	Lys	Asn	Ser
									245					250	
Tyr	Thr	Pro	Cys	Leu	Asn	Gln	Phe	Pro	Gln	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Lys
									260					265	
Ile	Ser	Ala	Glu	Val	Met	Trp	Ser	Leu	Phe	Ala	Gln	Asp	Met	Lys	Tyr
									275					280	
Ala	Met	Glu	Glu	His	Asp	Lys	His	Arg	Leu	Cys	Lys	Ser	Ala	Asp	Tyr
									290					295	
Met	Asn	Leu	His	Phe	Lys	Val	Lys	Trp	Leu	Tyr	Asn	Glu	Tyr	Val	Ala
									305					310	
Glu	Leu	Pro	Thr	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Pro	Glu	Tyr	Pro	Ala	Trp	Phe
									325					330	
Glu	Pro	Phe	Val	Ile	Gln	Trp	Leu	Asp	Glu	Asn	Glu	Glu	Val	Ser	Arg
									340					345	
Asp	Phe	Leu	His	Gly	Ala	Leu	Glu	Arg	Asp	Lys	Lys	Asp	Gly	Phe	Gln
									355					360	

29 30
 Gln Thr Ser Glu His Ala Leu Phe Ser Cys Ser Val Val Asp Val Phe
 370 375 380
 Ser Gln Leu Asn Gln Ser Phe Glu Ile Ile Lys Lys Leu Glu Cys Pro
 385 390 395 400
 Asp Pro Gln Ile Val Gly His Tyr Met Arg Arg Phe Ala Lys Thr Ile
 405 410 415
 Ser Asn Val Leu Leu Gln Tyr Ala Asp Ile Val Ser Lys Asp Phe Ala
 420 425 430
 Ser Tyr Cys Ser Lys Glu Lys Glu Lys Val Pro Cys Ile Leu Met Asn
 435 440 445
 Asn Thr Gln Gln Leu Arg Val Gln Leu Glu Lys Met Phe Glu Ala Met
 450 455 460
 Gly Gly Lys Glu Leu Asp Ala Glu Ala Ser Gly Thr Leu Lys Glu Leu
 465 470 475 480
 Gln Val Lys Leu Asn Asn Val Leu Asp Glu Leu Ser His Val Phe Ala
 485 490 495
 Thr Ser Phe Gln Pro His Ile Glu Glu Cys Val Arg Gln Met Gly Asp
 500 505 510
 Ile Leu Ser Gln Val Lys Gly Thr Gly Asn Val Pro Ala Ser Ala Cys
 515 520 525
 Ser Ser Val Ala Gln Asp Ala Asp Asn Val Leu Gln Pro Ile Met Asp
 530 535 540
 Leu Leu Asp Ser Asn Leu Thr Leu Phe Ala Lys Ile Cys Glu Lys Thr
 545 550 555 560
 Val Leu Lys Arg Val Leu Lys Glu Leu Trp Lys Leu Val Met Asn Thr
 565 570 575
 Met Glu Arg Thr Ile Val Leu Pro Pro Leu Thr Asp Gln Thr Met Ile
 580 585 590
 Gly Thr Leu Leu Arg Lys His Gly Lys Gly Leu Glu Lys Gly Arg Val
 595 600 605
 Lys Leu Pro
 610

【0101】配列番号：2

配列の長さ：1718

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

* 起源

生物名：ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：125..1324

* 特徴を決定した方法：S

配列

CCACGCGTCC GGTCTGACG GCGCTGGAGC TGA
 GGGGCAG TGCGGATGCC CCAGGAAGGC 60
 TCCTAGGAAG AGGGGACCCA CGGTGACTTC CTA
 AGGAAGC GCGGTTCCCA GCCAGGGGTG 120
 CTGC ATG AGG GGC CGC AGG GGC GAT CGC
 ATG ACC ATC AAC ATC CAG GAG 169
 Met Arg Gly Arg Arg Gly Asp Arg
 Met Thr Ile Asn Ile Gln Glu
 1 5
 10 15
 CAC ATG GCC ATC AAC GTG TGC CCC GGG

31							32	
CCC	ATC	CGG	CCC	ATC	CGC	CAG	217	
His	Met	Ala	Ile	Asn	Val	Cys	Pro	Gly
Pro	Ile	Arg	Pro	Ile	Arg	Gln		
20								
25			30					
ATC	TCT	GAC	TAC	TTC	CCC	CGG	GGA	CCA
GGA	CCT	GAA	GGG	GGC	GGC	GGG	265	
Ile	Ser	Asp	Tyr	Phe	Pro	Arg	Gly	Pro
Gly	Pro	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly		
35							40	
45								
AGC	GGC	GGG	GAG	GCC	CCC	GCC	CAT	CTG
GTC	CCC	CTG	GCT	CTG	GCC	CCC	313	
Ser	Gly	Gly	Glu	Ala	Pro	Ala	His	Leu
Val	Pro	Leu	Ala	Leu	Ala	Pro		
50							55	
60								
CCT	GCA	GCC	CTC	CTT	GGG	GCC	ACC	ACG
CCT	GAG	GAT	GGT	GCG	GAG	GTG	361	
Pro	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Thr	Thr
Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Glu	Val		
65							70	
75								
GAC	AGC	TAT	GAC	TCG	GAT	GAT	GCC	ACC
GCC	CTA	GGC	AAG	CTG	GAG	TTT	409	
Asp	Ser	Tyr	Asp	Ser	Asp	Asp	Ala	Thr
Ala	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Phe		
80							85	
90							95	
GAC	CTT	CTC	TAC	GAC	CGG	GCC	TCC	TGC
ACT	CTG	CAC	GTA	TGC	ATC	CTC	457	
Asp	Leu	Leu	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ser	Cys
Thr	Leu	His	Val	Cys	Ile	Leu		
100								
105			110					
AGG	GCC	AAG	GGC	CTC	AAG	CCC	ATG	GAT
TTC	AAT	GGC	CTC	GCC	GAC	CCC	505	
Arg	Ala	Lys	Gly	Leu	Lys	Pro	Met	Asp
Phe	Asn	Gly	Leu	Ala	Asp	Pro		
115							120	
125								
TAC	GTC	AAG	CTG	CAC	TTG	CTG	CCT	GGA
GCC	TGT	AAG	GCC	AAT	AAG	CTA	553	
Tyr	Val	Lys	Leu	His	Leu	Leu	Pro	Gly
Ala	Cys	Lys	Ala	Asn	Lys	Leu		
130							135	
140								
AAA	ACG	AAG	ACT	CAG	AGG	AAC	ACA	CTG
AAT	CCC	GTG	TGG	AAT	GAG	GAC	601	
Lys	Thr	Lys	Thr	Gln	Arg	Asn	Thr	Leu

33					34				
Asn	Pro	Val	Trp	Asn	Glu	Asp			
	145					150			
		155							
CTG	ACT	TAC	AGC	GGG	ATC	ACA	GAT	GAC	
GAC	ATC	ACG	CAC	AAG	GTG	CTC		649	
Leu	Thr	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asp	Asp	
Asp	Ile	Thr	His	Lys	Val	Leu			
160					165				
	170					175			
AGG	ATC	GCC	GTC	TGT	GAT	GAG	GAC	AAG	
CTG	AGT	CAC	AAT	GAG	TTT	ATT		697	
Arg	Ile	Ala	Val	Cys	Asp	Glu	Asp	Lys	
Leu	Ser	His	Asn	Glu	Phe	Ile			
				180					
185					190				
GGG	GAG	ATC	CGC	GTG	CCC	CTC	CGC	CGC	
CTC	AAG	CCT	TCG	CAG	AAG	AAG		745	
Gly	Glu	Ile	Arg	Val	Pro	Leu	Arg	Arg	
Leu	Lys	Pro	Ser	Gln	Lys	Lys			
			195					200	
				205					
CAT	TTT	AAC	ATC	TGC	CTC	GAG	CGC	CAA	
GTC	CCG	CTG	GCG	TCC	CCC	TCT		793	
His	Phe	Asn	Ile	Cys	Leu	Glu	Arg	Gln	
Val	Pro	Leu	Ala	Ser	Pro	Ser			
		210					215		
			220						
TCC	ATG	TCA	GCG	GCG	CTG	AGG	GGC	ATC	
TCC	TGT	TAT	CTG	AAG	GAC	TTG		841	
Ser	Met	Ser	Ala	Ala	Leu	Arg	Gly	Ile	
Ser	Cys	Tyr	Leu	Lys	Asp	Leu			
	225					230			
		235							
GAG	CAG	GCG	GAG	CAG	GGG	CAG	GGG	CTG	
CTG	GAG	GAG	CGT	GGC	CGC	ATC		889	
Glu	Gln	Ala	Glu	Gln	Gly	Gln	Gly	Leu	
Leu	Glu	Glu	Arg	Gly	Arg	Ile			
240					245				
	250					255			
CTG	CTG	AGT	CTC	AGC	TAC	AGC	TCG	CGG	
CGC	CGG	GGA	CTG	CTG	GTA	GGC		937	
Leu	Leu	Ser	Leu	Ser	Tyr	Ser	Ser	Arg	
Arg	Arg	Gly	Leu	Leu	Val	Gly			
				260					
265					270				
ATC	TTG	CGC	TGC	GCC	CAT	CTG	GCT	GCC	
ATG	GAC	GTC	AAC	GGT	TAC	TCG		985	
Ile	Leu	Arg	Cys	Ala	His	Leu	Ala	Ala	
Met	Asp	Val	Asn	Gly	Tyr	Ser			
			275					280	

35

36

285

GAC	CCC	TAC	GTC	AAG	ACG	TAC	CTG	AGG	
CCC	GAT	GTG	GAC	AAG	AAA	TCC			1033
Asp	Pro	Tyr	Val	Lys	Thr	Tyr	Leu	Arg	
Pro	Asp	Val	Asp	Lys	Lys	Ser			

290

295

300

AAG	CAT	AAG	ACG	TGT	GTG	AAG	AAG	AAG	
ACT	CTC	AAC	CCA	GAA	TTT	AAC			1081
Lys	His	Lys	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Lys	
Thr	Leu	Asn	Pro	Glu	Phe	Asn			

305

310

315

GAG	GAG	TTT	TTC	TAC	GAG	ATA	GAG	CTC	
TCC	ACT	CTG	GCC	ACC	AAG	ACC			1129
Glu	Glu	Phe	Phe	Tyr	Glu	Ile	Glu	Leu	
Ser	Thr	Leu	Ala	Thr	Lys	Thr			

320

325

330

335

CTG	GAA	GTC	ACC	GTC	TGG	GAC	TAT	GAC	
ATT	GGC	AAA	TCC	AAT	GAC	TTC			1177
Leu	Glu	Val	Thr	Val	Trp	Asp	Tyr	Asp	
Ile	Gly	Lys	Ser	Asn	Asp	Phe			

340

345

350

ATT	GGT	GGC	GTG	TCC	CTG	GGG	CCA	GGT	
GCC	CGA	GGC	GAG	GCT	CGG	AAG			1225
Ile	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Gly	Pro	Gly	
Ala	Arg	Gly	Glu	Ala	Arg	Lys			

355

360

365

CAC	TGG	AGT	GAC	TGC	CTG	CAG	CAG	CGG	
GAC	GCA	GCC	CTG	GAG	CGC	TGG			1273
His	Trp	Ser	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Arg	
Asp	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Trp			

370

375

380

CAC	ACC	CTG	ACC	AGT	GAG	CTG	CCC	CCT	
GCG	GCC	GGG	GCT	CTG	TCC	TCA			1321
His	Thr	Leu	Thr	Ser	Glu	Leu	Pro	Pro	
Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ser	Ser			

385

390

395

GCC	TGAGTGGACA	GCAGTGTCCC	GGCACAGGCC	
CATCGAGCCG	GGTCCAGTAC			1374

Ala

400

CCAACCTTCG	CACGAGTGTG	TTGCACGTTT	ACA	
CAGGTGG	GCTGCCCCAC	CCTGCACTAC		1434
CTATTTTGTG	AGTCTCGTGA	CCCGGGTCTG	TCT	

37 38

GCTCATG AGGGGCTGCG GAGTTCTATA 1494
 TTCACATATG CAAACCTCCT GCCTGACTCG CTA
 GTCCCTG CAAATATGCA AACCCCCCTA 1554
 CTA CTACTGCACA CCCGGGCAGT GCTCAGAGCC GCC
 CAGGCCC CGCGCTCCTC ACTCCTGCCT 1614
 CTCCACGCTG CCCCGTCCCT CTCCCCCAAC AGG
 GAGGAGG TCGGATTAGG GAGGTTTCAGA 1674
 GGAGGAGAAT GTCTCAAAAA AAAAAAAAAA AAA
 AAAAAA AAAA 1718

【0102】配列番号：3

* 起源

配列の長さ：25

生物名：ヒト

配列の型：アミノ酸

他の情報：この配列は、Doc2αの13～37位のアミノ酸配列に相当する

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列：

Ile Gln Glu His Met Ala Ile Asn Val Cys Pro Gly Pro Ile Arg Pro
 1 5 10 15
 Ile Arg Gln Ile Ser Asp Tyr Phe Pro
 20 25

【0103】配列番号：4

※ 起源

配列の長さ：5318

生物名：ラット

配列の型：核酸

配列の特徴

鎖の数：二本鎖

特徴を表す記号：CDS

トポロジー：直鎖状

存在位置：30..5315

配列の種類：cDNA to mRNA

※ 特徴を決定した方法：S

配列

GTATTGAAGT GGGAAATGGA GGGTCGGGG ATG AAG CGA CAT GGC CGG CGA CCG 50
 Met Lys Arg His Gly Arg Arg Pro
 1 5
 GGC CCC AGC GTA AGC TCT GAG CCC CGC GCT GCG CCC GCC GCG CTC TGG 98
 Gly Pro Ser Val Ser Ser Glu Pro Arg Ala Ala Pro Ala Ala Leu Trp
 10 15 20
 CCG CCT GGA GTC ATG TCT CTG CTG TGC GTG GGA GTC AAA AAA GCC AAG 146
 Pro Pro Gly Val Met Ser Leu Leu Cys Val Gly Val Lys Lys Ala Lys
 25 30 35 40
 TTT GAC GGT GCC CAA GAG AAG TTC AAC ACA TAC GTG ACG CTG AAG GTG 194
 Phe Asp Gly Ala Gln Glu Lys Phe Asn Thr Tyr Val Thr Leu Lys Val
 45 50 55
 CAG AAC GTG AAG AGC ACT ACC ATA GCT GTA CGC GGC AGC CAG CCT AGC 242
 Gln Asn Val Lys Ser Thr Thr Ile Ala Val Arg Gly Ser Gln Pro Ser
 60 65 70
 TGG GAG CAG GAC TTC ATG TTT GAG ATC AAC CGC CTG GAT CTG GGC CTG 290
 Trp Glu Gln Asp Phe Met Phe Glu Ile Asn Arg Leu Asp Leu Gly Leu
 75 80 85
 ACG GTG GAG GTG TGG AAC AAG GGT CTC ATC TGG GAC ACA ATG GTG GGT 338
 Thr Val Glu Val Trp Asn Lys Gly Leu Ile Trp Asp Thr Met Val Gly
 90 95 100
 ACT GTG TGG ATC CCA CTT CGG ACC ATC CGT CAG TCC AAT GAG GAG GGT 386
 Thr Val Trp Ile Pro Leu Arg Thr Ile Arg Gln Ser Asn Glu Glu Gly
 105 110 115 120

39	40
CCG GGA GAA TGG CTG ACA CTG GAC TCT CAG GCC ATC ATG GCG GAC AGT Pro Gly Glu Trp Leu Thr Leu Asp Ser Gln Ala Ile Met Ala Asp Ser	434
125 130 135	
GAG ATC TGT GGG ACC AAG GAC CCC ACC TTC CAC CGC ATC CTC CTG GAC Glu Ile Cys Gly Thr Lys Asp Pro Thr Phe His Arg Ile Leu Leu Asp	482
140 145 150	
GCA CAT TTT GAG CTG CCT TTG GAC ATC CCC GAG GAG GAG GCG CGC TAC Ala His Phe Glu Leu Pro Leu Asp Ile Pro Glu Glu Glu Ala Arg Tyr	530
155 160 165	
TGG GCC AAG AAG CTG GAG CAG CTG AAT GCC ATG CGT GAC CAA GAT GAG Trp Ala Lys Lys Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Arg Asp Gln Asp Glu	578
170 175 180	
TAC TCC TTT CAG GAC CAG CAG GAC AAG CCA CTG CCG GTG CCC AGC AGC Tyr Ser Phe Gln Asp Gln Gln Asp Lys Pro Leu Pro Val Pro Ser Ser	626
185 190 195 200	
CAG TGC TGC AAC TGG AAT TAC TTT GGC TGG GGA GAA CAG AAT GAT GAT Gln Cys Cys Asn Trp Asn Tyr Phe Gly Trp Gly Glu Gln Asn Asp Asp	674
205 210 215	
CCC GAC AGT GCC GTG GAT GAC CGG GAC AGT GAT TAT AGG AGT GAG ACG Pro Asp Ser Ala Val Asp Asp Arg Asp Ser Asp Tyr Arg Ser Glu Thr	722
220 225 230	
AGC AAC AGC ATC CCA CCG CCT TAC TAC ACG ACT TCG CAG CCC AAT GCT Ser Asn Ser Ile Pro Pro Pro Tyr Tyr Thr Thr Ser Gln Pro Asn Ala	770
235 240 245	
TCG GTG CAC CAG TAC TCC GTG CGG CCA CCC CCT CTG GGG TCC CGG GAG Ser Val His Gln Tyr Ser Val Arg Pro Pro Pro Leu Gly Ser Arg Glu	818
250 255 260	
TCC TAC AGC GAC TCC ATG CAC AGC TAT GAA GAG TTC TCT GAG CCG CGG Ser Tyr Ser Asp Ser Met His Ser Tyr Glu Glu Phe Ser Glu Pro Arg	866
265 270 275 280	
GCA CTC AGT CCC ACA GGC AGC AGC CGC TAT GCT TCC AGT GGG GAG CTG Ala Leu Ser Pro Thr Gly Ser Ser Arg Tyr Ala Ser Ser Gly Glu Leu	914
285 290 295	
AGC CAG GGC AGC TCC CAG CTG AGT GAG GAC TTC GAC CCG GAT GAG CAC Ser Gln Gly Ser Ser Gln Leu Ser Glu Asp Phe Asp Pro Asp Glu His	962
300 305 310	
AGC CTA CAG GGC TCA GAG CTG GAT GAC GAG AGG GAC CGA GAT TCT TAT Ser Leu Gln Gly Ser Glu Leu Asp Asp Glu Arg Asp Arg Asp Ser Tyr	1010
315 320 325	
CAC TCC TGC CAC AGC TCT GTG AGC TAC CAC AAG GAC TCA CCC CGC TGG His Ser Cys His Ser Ser Val Ser Tyr His Lys Asp Ser Pro Arg Trp	1058
330 335 340	
GAC CAG GAT GAG GAG GAC CTG GAG GAC CTG GAG GAC CTG GAA GAT GAG Asp Gln Asp Glu Glu Asp Leu Glu Asp Leu Glu Asp Leu Glu Asp Glu	1106
345 350 355 360	
GAG TTG CCC GAG GAA GAG GAG TTG GAA GAG GAG GAG TTG GAG GAG GAG Glu Leu Pro Glu Glu Glu Leu Glu Glu Glu Glu Leu Glu Glu Glu	1154
365 370 375	
GAG GAG TTG GAG GAA GAG GAA TTG GAG TTG GAG GAG GAG GAG GAG GTG Glu Glu Leu Glu Glu Glu Glu Leu Glu Leu Glu Glu Glu Glu Val	1202

41		42
380	385	390
CCT GAT GAC CTG GCC AGC TAT ACC CAG CAG GAG GAC ACC ACT GTG GCT		1250
Pro Asp Asp Leu Ala Ser Tyr Thr Gln Gln Glu Asp Thr Thr Val Ala		
395	400	405
GAG CCC AAA GAG TTC AAG CGG ATC AGC TTC CCA ACA GCT GCA CCT CAG		1298
Glu Pro Lys Glu Phe Lys Arg Ile Ser Phe Pro Thr Ala Ala Pro Gln		
410	415	420
AAG GAA GAC AAA GTT TCA GCT GTG CCC ATT GAG GCC CCC GAT GTG TCC		1346
Lys Glu Asp Lys Val Ser Ala Val Pro Ile Glu Ala Pro Asp Val Ser		
425	430	435
AAA GGC ATC CCC AAG GCA GCC ACA CCT GAA GAG AAG GCA GCT GCG GAG		1394
Lys Gly Ile Pro Lys Ala Ala Thr Pro Glu Glu Lys Ala Ala Ala Glu		
445	450	455
TGT GCA CAG GAA GCG GAG CCC CCC AAG TCT GAG GAG AGT TTC AGA TCT		1442
Cys Ala Gln Glu Ala Glu Pro Pro Lys Ser Glu Glu Ser Phe Arg Ser		
460	465	470
CGA GAG GCT GAG GAG GGC CAG GAA GGG CAG GAT GCC ATG TCC AGG GCC		1490
Arg Glu Ala Glu Glu Gly Gln Glu Gly Gln Asp Ala Met Ser Arg Ala		
475	480	485
AAA GCC AAC TGG TTG CGA GCC TTC AAC AAG GTG CGC ATG CAG CTG CAG		1538
Lys Ala Asn Trp Leu Arg Ala Phe Asn Lys Val Arg Met Gln Leu Gln		
490	495	500
GAG GCC CGA GGA GAA GGA GAG ATG TCC AAG TCT CTG TGG TTC AAA GGC		1586
Glu Ala Arg Gly Glu Gly Glu Met Ser Lys Ser Leu Trp Phe Lys Gly		
505	510	515
GGC CCT GGT GGT GGC CTT ATC ATC ATT GAC AGC ATG CCA GAC ATC AGG		1634
Gly Pro Gly Gly Gly Leu Ile Ile Ile Asp Ser Met Pro Asp Ile Arg		
525	530	535
AAG CGG AAG CCC ATT CCC CTC GTG AGC GAC CTG GCT ATG TCT CTG GTC		1682
Lys Arg Lys Pro Ile Pro Leu Val Ser Asp Leu Ala Met Ser Leu Val		
540	545	550
CAG TCA CGG AAG GCG GGC ATC ACC TCG GCC TTG GCC TCC AGC ACG TTG		1730
Gln Ser Arg Lys Ala Gly Ile Thr Ser Ala Leu Ala Ser Ser Thr Leu		
555	560	565
AAC AAT GAA GAG TTG AAA AAC CAC GTT TAC AAG AAG ACC CTG CAA GCC		1778
Asn Asn Glu Glu Leu Lys Asn His Val Tyr Lys Lys Thr Leu Gln Ala		
570	575	580
TTA ATC TAC CCC ATC TCC TGC ACC ACG CCG CAC AAC TTC GAG GTG TGG		1826
Leu Ile Tyr Pro Ile Ser Cys Thr Thr Pro His Asn Phe Glu Val Trp		
585	590	595
ACG GCC ACC ACT CCC ACC TAC TGC TAC GAG TGC GAG GGG CTG CTG TGG		1874
Thr Ala Thr Thr Pro Thr Tyr Cys Tyr Glu Cys Glu Gly Leu Leu Trp		
605	610	615
GGC ATC GCG CGG CAG GGC ATG CGC TGC ACC GAG TGC GGC GTT AAG TGC		1922
Gly Ile Ala Arg Gln Gly Met Arg Cys Thr Glu Cys Gly Val Lys Cys		
620	625	630
CAC GAG AAG TGC CAA GAC CTG CTC AAC GCG GAC TGC CTG CAG CGG GCG		1970
His Glu Lys Cys Gln Asp Leu Leu Asn Ala Asp Cys Leu Gln Arg Ala		
635	640	645
GCT GAG AAG AGT TCT AAG CAT GGC GCT GAA GAC CGC ACG CAG AAC ATC		2018

43		44
Ala Glu Lys Ser Ser Lys His Gly Ala Glu Asp Arg Thr Gln Asn Ile		
650	655	660
ATC ATG GTG CTG AAG GAC CGC ATG AAG ATC CGC GAG CGC AAC AAG CCT		2066
Ile Met Val Leu Lys Asp Arg Met Lys Ile Arg Glu Arg Asn Lys Pro		
665	670	675
GAG ATC AGC TGA TCC AGG AGG TCT TCG CGG TCA CCA AGA GCG CAT TCG		2114
Glu Ile Phe Glu Leu Ile Gln Glu Val Phe Ala Val Thr Lys Ser Ala		
685	690	695
CAC ACA CAG CAG ATG AAG GCC GTC AAG CAG AGT GTG CTG GAT GGC ACA		2162
His Thr Gln Gln Met Lys Ala Val Lys Gln Ser Val Leu Asp Gly Thr		
700	705	710
TCC AAG TGG TCT GCC AAA ATT AGC ATC ACG GTG GTC TGT GCC CAG GGC		2210
Ser Lys Trp Ser Ala Lys Ile Ser Ile Thr Val Val Cys Ala Gln Gly		
715	720	725
TTG CAG GCC AAG GAC AAG ACA GGA TCC AGT GAC CCT TAT GTC ACC GTC		2258
Leu Gln Ala Lys Asp Lys Thr Gly Ser Ser Asp Pro Tyr Val Thr Val		
730	735	740
CAG GAC CAA GAA AAG GAC AAA AAC CAT CTA CGG GAA CCT TTT GGG AAG		2306
Gln Val Gly Lys Thr Lys Lys Arg Thr Lys Thr Ile Tyr Gly Asn Leu		
745	750	755
AAC CCA GTG TGG GAA GAG AAT TTC CAC TTT GAA TGT CAC AAC TCC TCT		2354
Asn Pro Val Trp Glu Glu Asn Phe His Phe Glu Cys His Asn Ser Ser		
765	770	775
GAC CGG ATC AAG GTG CGT GTG TTG GAT GAA GAC GAT GAC ATC AAA TCC		2402
Asp Arg Ile Lys Val Arg Val Leu Asp Glu Asp Asp Asp Ile Lys Ser		
780	785	790
CGT GTG AAG CAA AGG TTT AAG AGG GAG TCT GAT GAC TTC CTA GGG CAG		2450
Arg Val Lys Gln Arg Phe Lys Arg Glu Ser Asp Asp Phe Leu Gly Gln		
795	800	805
ACA ATC ATC GAG GTG CGG ACG CTT AGC GGC GAG ATG GAT GTG TGG TAC		2498
Thr Ile Ile Glu Val Arg Thr Leu Ser Gly Glu Met Asp Val Trp Tyr		
810	815	820
AAT CTG GAC AAG AGA ACA GAC AAG TCT GCT GTG TCG GGC GCC ATT CGG		2546
Asn Leu Asp Lys Arg Thr Asp Lys Ser Ala Val Ser Gly Ala Ile Arg		
825	830	835
CTT CAC ATC AGT GTG GAG ATC AAA GGG GAG GAG AAG GTG GCA CCC TAC		2594
Leu His Ile Ser Val Glu Ile Lys Gly Glu Glu Lys Val Ala Pro Tyr		
845	850	855
CAT GTC CAG TAC ACC TGT CTG CAT GAG AAC CTG TTC CAT TTT GTG ACG		2642
His Val Gln Tyr Thr Cys Leu His Glu Asn Leu Phe His Phe Val Thr		
860	865	870
GAT GTA CAG AAC AAT GGC GTG GTG AAG ATT CCC GAT GCC AAA GGT GAC		2690
Asp Val Gln Asn Asn Gly Val Val Lys Ile Pro Asp Ala Lys Gly Asp		
875	880	885
GAC GCC TGG AAG GTT TAC TAT GAT GAG ACT GCC CAG GAG ATC GTG GAT		2738
Asp Ala Trp Lys Val Tyr Tyr Asp Glu Thr Ala Gln Glu Ile Val Asp		
890	895	900
GAG TTT GCC ATG CGC TAT GGC GTT GAA TCC ATC TAC CAA GCC ATG ACC		2786
Glu Phe Ala Met Arg Tyr Gly Val Glu Ser Ile Tyr Gln Ala Met Thr		
905	910	915
		920

45		46
CAC TTT GCC TGC CTC TCC TCC AAG TAC ATG TGC CCT GGG GTA CCC GCT		2834
His Phe Ala Cys Leu Ser Ser Lys Tyr Met Cys Pro Gly Val Pro Ala		
925	930	935
GTC ATG AGC ACC CTG CTT GCC AAC ATC AAC GCC TAC TAC GCA CAC ACC		2882
Val Met Ser Thr Leu Leu Ala Asn Ile Asn Ala Tyr Tyr Ala His Thr		
940	945	950
ACC GCC TCC ACC AAC GTG TCT GCC TCC GAC CGC TTC GCT GCC TCC AAT		2930
Thr Ala Ser Thr Asn Val Ser Ala Ser Asp Arg Phe Ala Ala Ser Asn		
955	960	965
TTC GGG AAA GAG CGC TTT GTG AAA CTT CTG GAC CAG CTG CAC AAC TCC		2978
Phe Gly Lys Glu Arg Phe Val Lys Leu Leu Asp Gln Leu His Asn Ser		
970	975	980
CTG CGG ATT GAC CTG TCC ATG TAC CGG AAC AAC TTC CCG GCC AGC AGC		3026
Leu Arg Ile Asp Leu Ser Met Tyr Arg Asn Asn Phe Pro Ala Ser Ser		
985	990	995
CCC GAG CGG CTG CAG GAT CTC AAG TCC ACA GTG GAC CTG CTT ACC AGC		3074
Pro Glu Arg Leu Gln Asp Leu Lys Ser Thr Val Asp Leu Leu Thr Ser		
1005	1010	1015
ATC ACC TTC TTC CGG ATG AAG GTT CAG GAA CTG CAG AGT CCG CCA CGT		3122
Ile Thr Phe Phe Arg Met Lys Val Gln Glu Leu Gln Ser Pro Pro Arg		
1020	1025	1030
GCC AGT CAG GTG GTG AAG GAC TGC GTG AAG GCG TGC CTC AAC TCC ACC		3170
Ala Ser Gln Val Val Lys Asp Cys Val Lys Ala Cys Leu Asn Ser Thr		
1035	1040	1045
TAC GAG TAC ATC TTC AAC AAC TGT CAT GAG CTC TAT GGC CGG GAG TAC		3218
Tyr Glu Tyr Ile Phe Asn Asn Cys His Glu Leu Tyr Gly Arg Glu Tyr		
1050	1055	1060
CAG ACA GAC CCG GCC AAG AAG GGG GAG GTC CCC CCG GAG GAG CAA GGC		3266
Gln Thr Asp Pro Ala Lys Lys Gly Glu Val Pro Pro Glu Glu Gln Gly		
1065	1070	1075
CCT AGC ATC AAG AAC CTG GAT TTC TGG TCC AAG CTC ATC ACC CTC ATC		3314
Pro Ser Ile Lys Asn Leu Asp Phe Trp Ser Lys Leu Ile Thr Leu Ile		
1085	1090	1095
GTG TCT ATC ATT GAG GAG GAT AAG AAC TCC TAC ACA CCC TGC CTC AAT		3362
Val Ser Ile Ile Glu Glu Asp Lys Asn Ser Tyr Thr Pro Cys Leu Asn		
1100	1105	1110
CAG TTT CCC CAG GAG CTG AAT GTG GGG AAG ATC AGT GCT GAG GTG ATG		3410
Gln Phe Pro Gln Glu Leu Asn Val Gly Lys Ile Ser Ala Glu Val Met		
1115	1120	1125
TGG AGC CTG TTT GCC CAG GAC ATG AAG TAC GCC ATG GAG GAA CAC GAC		3458
Trp Ser Leu Phe Ala Gln Asp Met Lys Tyr Ala Met Glu Glu His Asp		
1130	1135	1140
AAG CAC CGG CTG TGT AAG AGC GCA GAC TAC ATG AAC CTG CAT TTC AAG		3506
Lys His Arg Leu Cys Lys Ser Ala Asp Tyr Met Asn Leu His Phe Lys		
1145	1150	1155
GTC AAG TGG TTG TAC AAC GAG TAC GTG GCT GAA CTG CCC ACC TTC AAG		3554
Val Lys Trp Leu Tyr Asn Glu Tyr Val Ala Glu Leu Pro Thr Phe Lys		
1165	1170	1175
GAC CGC GTG CCG GAG TAC CCT GCG TGG TTT GAG CCC TTC GTC ATC CAG		3602
Asp Arg Val Pro Glu Tyr Pro Ala Trp Phe Glu Pro Phe Val Ile Gln		

47		48
1180	1185	1190
TGG TTA GAT GAG AAT GAG GAG GTG TCC CGG GAC TTC CTG CAT GGT GCA		3650
Trp Leu Asp Glu Asn Glu Glu Val Ser Arg Asp Phe Leu His Gly Ala		
1195	1200	1205
CTC GAG CGG GAC AAG AAG GAT GGG TTC CAG CAG ACA TCG GAG CAC GCC		3698
Leu Glu Arg Asp Lys Lys Asp Gly Phe Gln Gln Thr Ser Glu His Ala		
1210	1215	1220
CTG TTC TCT TGC TCG GTA GTG GAC GTC TTC TCC CAG CTC AAC CAG AGC		3746
Leu Phe Ser Cys Ser Val Val Asp Val Phe Ser Gln Leu Asn Gln Ser		
1225	1230	1235
TTT GAG ATC ATC AAG AAG CTG GAG TGT CCT GAC CCC CAG ATT GTG GGC		3794
Phe Glu Ile Ile Lys Lys Leu Glu Cys Pro Asp Pro Gln Ile Val Gly		
1245	1250	1255
CAC TAC ATG CGG CGC TTT GCC AAG ACC ATT AGC AAT GTG CTT CTC CAG		3842
His Tyr Met Arg Arg Phe Ala Lys Thr Ile Ser Asn Val Leu Leu Gln		
1260	1265	1270
TAC GCC GAC ATC GTC TCC AAG GAC TTC GCT TCC TAC TGC TCC AAG GAG		3890
Tyr Ala Asp Ile Val Ser Lys Asp Phe Ala Ser Tyr Cys Ser Lys Glu		
1275	1280	1285
AAG GAG AAA GTG CCC TGC ATC CTC ATG AAC AAC ACA CAG CAG CTG CGG		3938
Lys Glu Lys Val Pro Cys Ile Leu Met Asn Asn Thr Gln Gln Leu Arg		
1290	1295	1300
GTG CAG CTG GAG AAG ATG TTC GAG GCG ATG GGT GGG AAG GAG CTG GAC		3986
Val Gln Leu Glu Lys Met Phe Glu Ala Met Gly Gly Lys Glu Leu Asp		
1305	1310	1315
GCC GAG GCC AGC GGA ACC CTG AAG GAG CTG CAG GTG AAA CTC AAC AAT		4034
Ala Glu Ala Ser Gly Thr Leu Lys Glu Leu Gln Val Lys Leu Asn Asn		
1325	1330	1335
GTC CTG GAT GAA CTC AGC CAC GTG TTT GCC ACC AGC TTC CAG CCA CAC		4082
Val Leu Asp Glu Leu Ser His Val Phe Ala Thr Ser Phe Gln Pro His		
1340	1345	1350
ATC GAG GAG TGT GTC AGA CAA ATG GGT GAC ATC CTA AGC CAA GTG AAG		4130
Ile Glu Glu Cys Val Arg Gln Met Gly Asp Ile Leu Ser Gln Val Lys		
1355	1360	1365
GGC ACG GGC AAC GTG CCC GCC AGT GCC TGC AGC AGC GTG GCA CAG GAC		4178
Gly Thr Gly Asn Val Pro Ala Ser Ala Cys Ser Ser Val Ala Gln Asp		
1370	1375	1380
GCA GAC AAC GTG CTA CAG CCC ATC ATG GAT CTT CTG GAC AGC AAC CTC		4226
Ala Asp Asn Val Leu Gln Pro Ile Met Asp Leu Leu Asp Ser Asn Leu		
1385	1390	1395
ACC CTG TTT GCC AAA ATC TGT GAG AAG ACG GTT CTG AAG CGG GTG CTG		4274
Thr Leu Phe Ala Lys Ile Cys Glu Lys Thr Val Leu Lys Arg Val Leu		
1405	1410	1415
AAG GAG CTG TGG AAG CTG GTG ATG AAC ACC ATG GAG AGG ACC ATT GTC		4322
Lys Glu Leu Trp Lys Leu Val Met Asn Thr Met Glu Arg Thr Ile Val		
1420	1425	1430
CTG CCG CCA CTC ACT GAC CAG ACG ATG ATT GGT ACC CTC TTG AGA AAA		4370
Leu Pro Pro Leu Thr Asp Gln Thr Met Ile Gly Thr Leu Leu Arg Lys		
1435	1440	1445
CAT GGC AAG GGC CTA GAA AAG GGC AGG GTG AAA CTG CCA AGC CAC TCA		4418

49	50
His Gly Lys Gly Leu Glu Lys Gly Arg Val Lys Leu Pro Ser His Ser	
1450	1455 1460
GAC GGG ACA CAA ATG ATC TTC AAT GCC GCC AAG GAG CTG GGC CAG CTG	4466
Asp Gly Thr Gln Met Ile Phe Asn Ala Ala Lys Glu Leu Gly Gln Leu	
1465	1470 1475 1480
TCC AAA CTG AAG GAT CAC ATG GTG CGA GAA GAA GCC AAG AGC TTG ACC	4514
Ser Lys Leu Lys Asp His Met Val Arg Glu Glu Ala Lys Ser Leu Thr	
1485	1490 1495
CCG AAG CAG TGT GCC GTG GTT GAA CTG GCC CTG GAC ACC ATC AAG CAA	4562
Pro Lys Gln Cys Ala Val Val Glu Leu Ala Leu Asp Thr Ile Lys Gln	
1500	1505 1510
TAC TTC CAC GCG GGG GGC GTG GGC CTC AAG AAG ACC TTT CTC GAG AAA	4610
Tyr Phe His Ala Gly Gly Val Gly Leu Lys Lys Thr Phe Leu Glu Lys	
1515	1520 1525
AGC CCG GAC CTT CAG TCC CTG CGC TAC GCC CTG TCG CTC TAC ACA CAG	4658
Ser Pro Asp Leu Gln Ser Leu Arg Tyr Ala Leu Ser Leu Tyr Thr Gln	
1530	1535 1540
GCC ACC GAC CTG CTC ATC AAA ACC TTC GTG CAG ACG CAG TCA GCG CAG	4706
Ala Thr Asp Leu Leu Ile Lys Thr Phe Val Gln Thr Gln Ser Ala Gln	
1545	1550 1555 1560
GTC CAT GGT GGA AAG GGG ACT AGG TTT ACC CTT AGT GAA GAC GTT TGT	4754
Val His Gly Gly Lys Gly Thr Arg Phe Thr Leu Ser Glu Asp Val Cys	
1565	1570 1575
CCT GAG ATG GGC TCG GGT GTG GAA GAC CCT GTA GGT GAA GTA TCC GTC	4802
Pro Glu Met Gly Ser Gly Val Glu Asp Pro Val Gly Glu Val Ser Val	
1580	1585 1590
CAC GTG GAG CTG TTC ACG CAT CCG GGA ACT GGG GAA CAG AAG GTC ACA	4850
His Val Glu Leu Phe Thr His Pro Gly Thr Gly Glu Gln Lys Val Thr	
1595	1600 1605
GTG AAG GTG GTG GCC GCC AAC GAC CTC AAG TGG CAG ACT TCT GGC ATC	4898
Val Lys Val Val Ala Ala Asn Asp Leu Lys Trp Gln Thr Ser Gly Ile	
1610	1615 1620
TTC CGT CCG TTC ATT GAG GTC AAC ATC GTT GGA CCT CAG CTC AGC GAC	4946
Phe Arg Pro Phe Ile Glu Val Asn Ile Val Gly Pro Gln Leu Ser Asp	
1625	1630 1635 1640
AAG AAA CGA AAG TTC GCC ACC AAA TCG AAA AAC AAC AGC TGG GCG CCC	4994
Lys Lys Arg Lys Phe Ala Thr Lys Ser Lys Asn Asn Ser Trp Ala Pro	
1645	1650 1655
AAA TAT AAC GAG AGC TTC CAG TTC TCC CTG AGC GCC GAC GCG GGA CCC	5042
Lys Tyr Asn Glu Ser Phe Gln Phe Ser Leu Ser Ala Asp Ala Gly Pro	
1660	1665 1670
GAG TGC TAC GAG TTG CAG GTG TGC GTG AAG GAC TAC TGC TTC GCG CGC	5090
Glu Cys Tyr Glu Leu Gln Val Cys Val Lys Asp Tyr Cys Phe Ala Arg	
1675	1680 1685
GAG GAC CGC ACG GTG GAG CTG GCG GTG CTG CAG CTG CGG GAG CTG GCT	5138
Glu Asp Arg Thr Val Glu Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Glu Leu Ala	
1690	1695 1700
CAG CGC GGG AGC GCC GCG TGC TGG CTG CCG CTC GGC CGC CGC ATC CAC	5186
Gln Arg Gly Ser Ala Ala Cys Trp Leu Pro Leu Gly Arg Arg Ile His	
1705	1710 1715 1720

51 52
 ATG GAC GAC ACG GGG CTC ACA GTG CTG CGT ATC CTG TCG CAG CGC AGC 5234
 Met Asp Asp Thr Gly Leu Thr Val Leu Arg Ile Leu Ser Gln Arg Ser
 1725 1730 1735
 AAT GAC GAG GTG GCC AAG GAG TTC GTC AAG CTC AAG TCC GAC ACG CGC 5282
 Asn Asp Glu Val Ala Lys Glu Phe Val Lys Leu Lys Ser Asp Thr Arg
 1740 1745 1750
 TCG GCC GAG GAG GGC GGT GCC GCG CCT GCG CCC TAG 5318
 Ser Ala Glu Glu Gly Gly Ala Ala Pro Ala Pro
 1755 1760

【0104】配列番号：5 * 鎖の数：1本鎖
 配列の長さ：30 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 * 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 CATGAATTCC TTCACATCAG TGTGGAGATC 30

【0105】配列番号：6 ※ 鎖の数：1本鎖
 配列の長さ：30 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 ※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 CATGAATTCC ATGGGCGCAG GCGCGGCACC 30

【0106】配列番号：7 ★ 鎖の数：1本鎖
 配列の長さ：31 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 ★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 CATGAATTCG AGAAGGTGGC ACCCTACCAT G 31

【0107】配列番号：8 ☆ 鎖の数：1本鎖
 配列の長さ：33 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 ☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 CATGAATTCT CAGCTTGGCA GTTTCACCCT GCC 33

【0108】配列番号：9 ◆ 鎖の数：1本鎖
 配列の長さ：33 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 ◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 CATGAATTCT CAGGTGGCAA ACACGTGGCT GAG 33

【0109】配列番号：10 鎖の数：1本鎖
 配列の長さ：33 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 CATGAATTCT CAGAGTGCAC CATGCAGGAA GTC 33

【0110】配列番号：11 鎖の数：1本鎖
 配列の長さ：31 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 CATGAATTCC TCGAGGGGGA CAAGAAGGAT G 31

【0111】配列番号：12 鎖の数：1本鎖
 配列の長さ：30 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列： 50

53

54

CATGAATTCA TGAAGCGACA TGGCCGGCGA

30

【0112】配列番号：13

配列の長さ：32

配列の型：核酸

* 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATAGCGCTC TTTCCCGAAA TTGGAGGCAG CG

32

【0113】配列番号：14

配列の長さ：33

配列の型：核酸

※ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATAGCGCTA GCCACTCAGA CGGGACACAA ATG

33

【0114】配列番号：15

配列の長さ：30

配列の型：核酸

★ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCC TAGGGCGCAG GCGCGGCACC

30

【0115】配列番号：16

配列の長さ：30

配列の型：核酸

☆ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCA TGAGGGGCCG CAGGGGCGAT

30

【0116】配列番号：17

配列の長さ：33

配列の型：核酸

◆ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCT CAGGCGGTGG CATCATCCGA GTC

33

【0117】配列番号：18

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCT CACTCCGCAC CATCCTCAGG CGT

33

【0118】配列番号：19

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCT CAGGGGAAGT AGTCAGAGAT CTG

33

【0119】配列番号：20

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCA TGACCATCAA CATCCAGGAG

30

【0120】配列番号：21

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCA TCCAGGAGCA CATGGCCATC

30

【0121】配列番号：22

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

50

55

56

CATGAATTCT CAGATCTGGC GGATGGGCCG GAT

33

【0122】配列番号：23

* 鎖の数：1本鎖

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCA TCAACGTGTG CCCCGGGCCC ATC

33

【0123】配列番号：24

※ 鎖の数：1本鎖

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCC AAGGCAAGCT GGAGTTTGAC

30

【0124】配列番号：25

★ 鎖の数：1本鎖

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCT CAGGCTGAGG ACAGAGCCCC

30

【0125】配列番号：26

☆ 鎖の数：1本鎖

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆20 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCA TGACCCTCCG GCGGCGCGG GAG

33

【0126】配列番号：27

◆ 鎖の数：1本鎖

配列の長さ：35

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCT CAGGCAGTGC AGTCGTCCGA CTCGT

35

【0127】配列番号：28

鎖の数：1本鎖

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

30 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCC ACGATGCATG GAAGGTGTAC

30

【0128】配列番号：29

鎖の数：1本鎖

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCT CAGGTGCCTG TCTGGTCAAT GAG

33

【0129】配列番号：30

鎖の数：1本鎖

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

40 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCA TGAGGGGCCG CAGGGGCGAT

30

【0130】配列番号：31

鎖の数：1本鎖

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCT CAGGCGGTGG CATCATCOGA GTC

33

【0131】配列番号：32

鎖の数：1本鎖

配列の長さ：31

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

50 配列の種類：他の核酸 合成DNA

57

58

配列:

CATGGATCCG AGAAGGTGGC ACCCTACCAT G

31

【0132】配列番号: 33

* 鎖の数: 1本鎖

配列の長さ: 33

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

* 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

CATGGATCCT CAGCTTGGCA GTTTCACCCT GCC

33

【0133】配列番号: 34

※ 鎖の数: 1本鎖

配列の長さ: 48

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

※10 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

AATTCGGTAC GATGTACCCA TACGACGTCC CAGACTACGC TGGTACCG

48

【0134】配列番号: 35

★ 鎖の数: 1本鎖

配列の長さ: 48

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

★ 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

GATCCGGTAC CAGCGTAGTC TGGGACGTCG TATGGGTACA TCGTACCG

48

【0135】配列番号: 36

☆ 鎖の数: 1本鎖

配列の長さ: 39

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

☆20 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

GATCGATGGA GCAGAAGCTT ATCAGCGAGG AGGACCTGG

39

【0136】配列番号: 37

◆ 鎖の数: 1本鎖

配列の長さ: 39

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

◆ 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

GATCCCAGGT CCTCCTCGCT GATAAGCTTC TGCTCCATC

39

【0137】配列番号: 38

鎖の数: 1本鎖

配列の長さ: 30

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

30 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

CATGGATCCA TGAGGGGCCG CAGGGGCGAT

30

【0138】配列番号: 39

鎖の数: 1本鎖

配列の長さ: 30

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

CATGGATCCT CAGGCTGAGG ACAGAGCCCC

30

【0139】配列番号: 40

鎖の数: 1本鎖

配列の長さ: 33

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

40 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

CATGGATCCT CACTGCTCCA AGTCCTTCAG ATA

33

【0140】配列番号: 41

鎖の数: 1本鎖

配列の長さ: 30

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

CATGGATCCC TAGGCAAGCT GGAGTTTGAC

30

【0141】配列番号: 42

配列の型: 核酸

配列の長さ: 30

50 鎖の数: 1本鎖

トポロジー：直鎖状

* * 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCA TGAAGCGACA TGGCCGGCGA

30

【0142】配列番号：43

※鎖の数：1本鎖

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCC TAGGGCGCAG GCGCGGCACC

30

【0143】配列番号：44

★鎖の数：1本鎖

配列の長さ：31

10 トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCG AGAAGGTGGC ACCCTACCAT G

31

【0144】配列番号：45

☆鎖の数：1本鎖

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCT CAGCTTGGCA GTTCCACCCT GCC

33

【図面の簡単な説明】

【図1】酵母two-hybrid法による、Munc13-1のDoc2 α と
の結合領域の解析結果を示す図表である。

【図2】酵母two-hybrid法による、Doc2 α のMunc13-1と
の結合領域の解析結果を示す図表である。

【図3】酵母two-hybrid法による、Doc2ファミリータン
パク質がMunc13ファミリータンパク質と結合するかを解
析した結果を示す図表である。

【図4】(a)大腸菌で作製し精製したMunc13-1-Didタン
パク質と、in vitro translationにより作製したDoc2 α
およびその欠失変異体タンパク質の、試験管内での結合
実験の結果を示す電気泳動の写真である。

(b)結合実験に用いたDoc2 α およびその欠失変異体タン
パク質を示す図である。

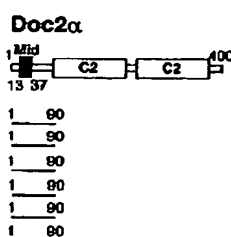
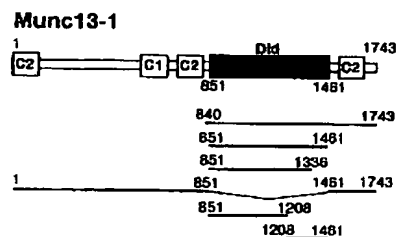
◆【図5】(a)大腸菌で作製し精製したDoc2 α -N末端タン
パク質(1-90アミノ酸)と、invitro translationによ
り作製したMunc13-1およびその欠失変異体タンパク質
の、試験管内での結合実験の結果を示す電気泳動の写真
である。

(b)結合実験に用いたMunc13-1およびその欠失変異体タ
ンパク質を示す図である。

【図6】PC12細胞内で、Doc2 α とMunc13-1が結合するこ
とを免疫沈降法により示した、ウェスタンブロット解析
の結果を示すX線写真である。

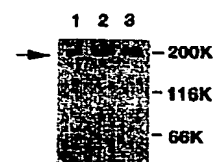
【図7】Doc2 α -MidおよびMunc13-1-Didが、PC12細胞に
おけるカルシウムイオン依存性の分泌を抑制すること、
成長ホルモンの分泌量を測定することにより調べた結果
を示す図である。

【図1】

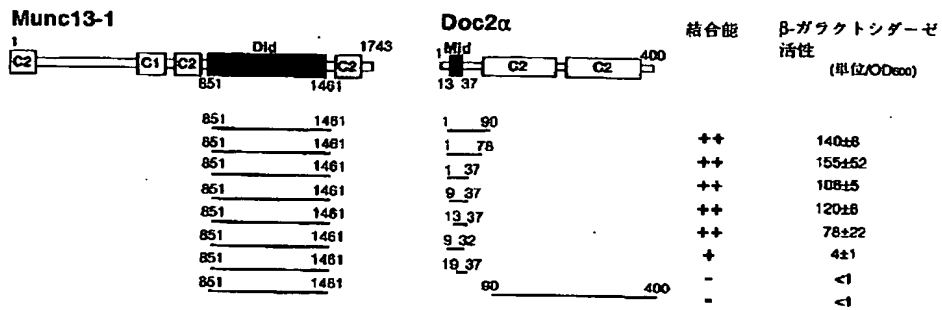


結合能	β -ガラクトシダーゼ 活性 (単位/OD ₄₀₀)
++	150 \pm 17
++	140 \pm 8
+	17 \pm 9
-	<1
-	<1
-	<1

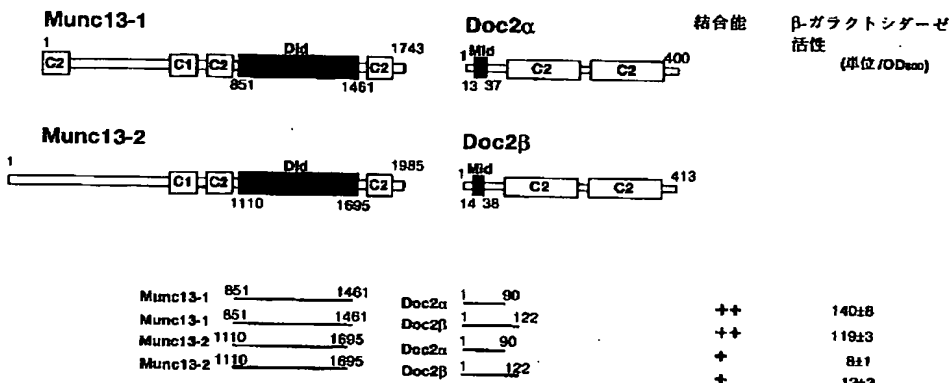
【図6】



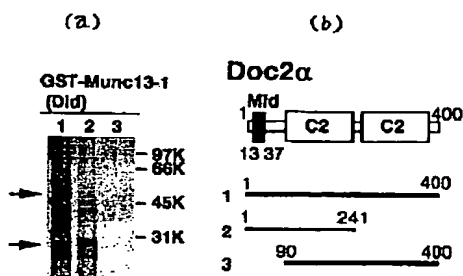
【図2】



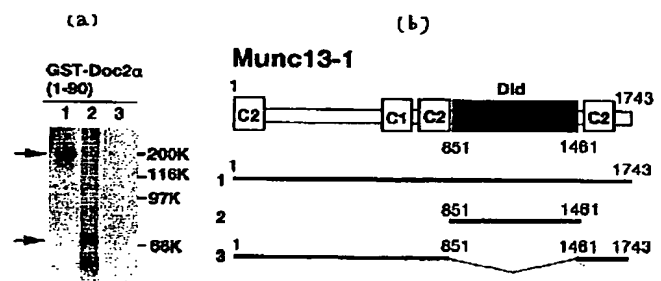
【図3】



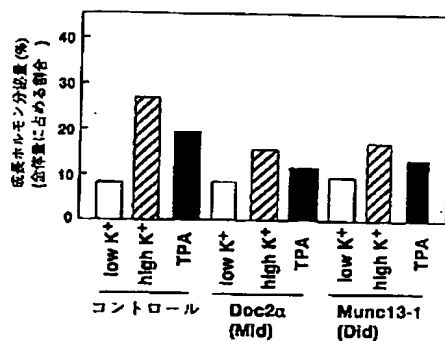
【図4】



【図5】



【図7】



BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

C 1 2 P 21/02

C 1 2 P 21/02

C

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

(72) 発明者 阪口 岳

大阪府吹田市昭和町13-16 グランシャリ
オミカサ301

(72) 発明者 高井 義美

兵庫県神戸市西区学園東町 2 - 5 - 73